

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

TOXICITÉ D'UN HERBICIDE À BASE DE GLYPHOSATE SUR DES CELLULES  
ET DES COMMUNAUTÉS D'ALGUES ET DE CYANOBACTÉRIES

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR  
ÉLISE SMEDBOL

DÉCEMBRE 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»



## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Philippe Juneau, qui m'a donné l'opportunité de faire la maîtrise dans son laboratoire. Merci de m'avoir accordé cette confiance. Je remercie également mes collègues de laboratoire, Annie Chalifour, Thibault Chesney, Francis Racine et Kui Chu, pour les discussions animées, leurs conseils et suggestions, ainsi que leur générosité et leur pédagogie. Je vous souhaite le meilleur dans la poursuite de vos objectifs professionnels.

Je tiens aussi à remercier mon co-directeur de recherche, Marc Lucotte, ainsi que son équipe dévouée. Merci pour votre accueil généreux dans le laboratoire, votre disponibilité et vos précieux conseils techniques. Un merci spécial à Serge Paquet pour sa disponibilité et son support constant. Je voudrais aussi remercier Irina Moukhina, pour son travail minutieux qui a grandement contribué au succès de mon expérience.

Mon expérience académique n'aurait pas été si enrichissante sans la présence des professeurs et étudiants du projet SABRE. Merci de m'avoir sensibilisée à la réalité pluridisciplinaire d'un projet en environnement, avec tout ce que cela comporte! Merci à Laurent Lepage, Michel Labrecque, Louise Hénault-Éthier, Gabriel Dagenais et Jean-François Racine. Un merci particulier à Marcelo Gomes, Sophie Maccario et Marie-Ève Lamoureux-Laprise, pour votre collaboration et pour les fous rires partagés.

Les derniers remerciements sont pour ma famille et mes amis qui m'ont continuellement supportée et encouragée de toutes les manières possibles. Un merci spécial à Fred, pour ton implication et ta présence dans notre vie quotidienne. Je vous aime!



## AVANT-PROPOS

Ce mémoire fut réalisé dans le cadre du projet SABRE (*Salix* en agriculture pour des bandes riveraines énergétiques), dirigé par quatre chercheurs principaux, les professeurs Philippe Juneau, Marc Lucotte, Michel Labrecque et Laurent Lepage. Il a été rédigé sous la forme de deux articles scientifiques en anglais, qui seront soumis pour publication dans les revues *Ecotoxicology and environmental safety* et *Aquatic toxicology*, suite au dépôt final de ce mémoire. Ma contribution scientifique aux deux articles est majeure et j'y figure comme auteur principal.

Chapitre II : Smedbol, É., Lucotte, M., Labrecque, M., Lepage, L. et Juneau, P. Glyphosate-based herbicide reduces algae and cyanobacteria growth and PSII capacity. À soumettre dans la revue *Ecotoxicology and environmental safety*. Pour cette expérience, j'ai effectué le travail en laboratoire, analysé les résultats et rédigé les différentes versions de l'article. Les quatre professeurs du projet SABRE ont supervisé les travaux en laboratoire et révisé le texte.

Chapitre III : Smedbol, É., Gomes, M.P., Paquet, S., Lucotte, M., Labrecque, M., Lepage, L. et Juneau, P. Low concentrations of glyphosate-based herbicide have deleterious effects on a freshwater phytoplankton community from an agricultural stream. À soumettre dans la revue *Aquatic toxicology*. Pour cette expérience, j'ai effectué le travail en laboratoire, analysé les résultats et écrit les différentes versions de l'article. L'étudiant au doctorat Marcelo P. Gomes a contribué aux mesures de stress oxydatif en laboratoire et à l'interprétation de ces résultats. Serge Paquet, chargé de cours à l'UQÀM, a contribué aux analyses statistiques et au dénombrement du phytoplancton. Les quatre professeurs du projet SABRE ont supervisé les travaux en laboratoire et révisé le texte.



## TABLES DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.....	III
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	IX
RÉSUMÉ.....	XVII
CHAPITRE I	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	
1.1 La problématique .....	1
1.2 Le glyphosate dans l'environnement .....	3
1.3 Évaluation du risque toxicologique.....	5
1.4 Les bioessais algaux.....	6
1.5 Le mode d'action du glyphosate .....	8
1.6 La photosynthèse.....	9
1.7 La fluorescence chlorophyllienne .....	11
1.8 Objectifs et hypothèses de recherche .....	14
CHAPITRE II	
2.1 Contributions.....	18
2.2 Abstract.....	18
2.3 Résumé.....	18
2.4 Introduction.....	19
2.5 Material and Methods .....	20
2.5.1 Algal cultures and testing procedure .....	20
2.5.2 Growth evaluation .....	21
2.5.3 Photosynthetic capacity measurements.....	22
2.5.4 Statistical analysis.....	23
2.6 Results.....	24
2.6.1 Growth .....	24
2.6.2 Photosynthesis .....	26
2.7 Discussion .....	28
2.8 Conclusion .....	32



2.9	Acknowledgments.....	33
2.10	References.....	35
CHAPITRE III		
3.1	Contributions.....	42
3.2	Abstract.....	42
3.3	Résumé.....	42
3.4	Introduction.....	43
3.5	Material and Methods.....	45
	3.5.1 Sampling and test conditions.....	45
	3.5.2 Physiological features.....	46
	3.5.3 Phytoplankton species determination.....	47
	3.5.4 Statistical analysis.....	48
3.6	Results.....	48
	3.6.1 Glyphosate pre-exposure and shikimate content.....	48
	3.6.2 Growth indicators.....	49
	3.6.3 Pigment content.....	50
	3.6.4 Oxidative markers.....	51
3.7	Discussion.....	55
3.8	Conclusion.....	58
3.9	Acknowledgments.....	59
3.10	References.....	61
CONCLUSION GENERALE.....		67
APPENDICE A.....		69
LISTE DES RÉFÉRENCES.....		71

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 a) Représentation schématique des différents composants de la chaîne de transport d'électrons b) Schéma en Z représentant les différents états énergétiques de la chaîne de transport d'électrons (Tirée de Govindjee <i>et al.</i> , 2010) .....	11
Figure 1.2 Modèle des flux d'énergie transitant par le PSII (Basée sur figure 1 dans Force <i>et al.</i> , 2003). .....	12
Figure 2.1 Energy fluxes in PSII of six algal and three cyanobacteria species exposed to increasing glyphosate concentrations for a 48 hours period, based on the model developed by Force <i>et al.</i> , (2003). A) Maximal PSII quantum yield ( $F_v/F_m$ ). B) Effective antenna size of an active reaction center ( $ABS/RC$ ). C) Effective dissipation of an active reaction center ( $DI_o/RC$ ). D) Maximal trapping rate of PSII ( $TR_o/RC$ ). E) Electron transport in an active reaction center ( $ET_o/RC$ ). The horizontal line represents the control treatment (100%).....	27
Figure 3.1 Shikimate contents in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide.....	49
Figure 3.2 Oxidative stress markers (MDA content, superoxide dismutase [SOD], catalase [CAT] and ascorbate peroxidase [APX]) in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide.....	52
Figure 3.3 Relationship between the Shannon's diversity index and glyphosate concentrations added to the growth media in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide.....	53
Figure 3.4 Relative biomass of the six major phytoplankton classes (A) and major phytoplankton species (more than 5% of total biomass) (B) in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide. ....	54



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
Tableau 1.1 Propriétés physico-chimiques du glyphosate (Santé Canada, 1987; Giesy <i>et al.</i> , 2000; CCME, 2008) .....	4
Tableau 1.3 Les effets du glyphosate sur la photosynthèse chez les végétaux .....	13
Tableau 2.1 Species used for bioassays, testing growth and photosynthetic capacity of algae and cyanobacteria exposed to glyphosate-based herbicide .....	21
Tableau 2.2 Photosynthetic parameters as described by Force <i>et al.</i> (2003), energy fluxes model, based on Strasser <i>et al.</i> (1995), measured using the Plant Efficiency Analyser .....	23
Tableau 2.3 Mean growth rates ( $\mu$ ) and standard deviations for each algae and cyanobacteria species at different glyphosate concentrations .....	25
Tableau 2.4 EC <sub>10</sub> values ( $\mu\text{g l}^{-1}$ of glyphosate) for each parameter (growth and photosynthesis) and each species exposed to increasing glyphosate concentrations for a 48 hours period .....	28
Tableau 3.1 Growth indicators (dry weight [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], abundance [ $\text{cells ml}^{-1}$ ] and specific biovolume [ $\text{mm}^3 \text{ml}^{-1}$ ]) in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide. ....	50
Tableau 3.2 Chlorophyll <i>a</i> , <i>b</i> and carotenoids content (% of pigment compared to control) and chlorophyll <i>a/b</i> ratio in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide. ....	51
Tableau A.1 Comparaison entre la toxicité du glyphosate seul et celle du glyphosate combiné avec différents surfactants dans les mélanges commerciaux .....	69
Tableau A.2 Equations for log-log regressions in Chapter I .....	70



## LISTE DES ABBRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

<i>A</i>	Taux photosynthétique net
AAA	Acides aminés aromatiques
ABS/RC	Quantité d'énergie absorbée/centre réactionnel du PSII
ALA	Acide $\delta$ -aminolevulinique
AMPA	Acide aminométhylphosphonique
APX	Ascorbate peroxidase
ATP	Adénosine triphosphate
BBM	Bold Basal Medium
Ca	Calcium
CAT	Catalase
CCME	Conseil Canadien des Ministres de l'environnement
CE <sub>10</sub>	Concentration effective causant 10% d'effet
CE <sub>50</sub>	Concentration effective médiane
Chl <i>a</i>	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophylle <i>b</i>
Chl*	Chlorophylle excitée
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPCC	Canadian Physiological Culture Center
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DI <sub>0</sub> /RC	Quantité d'énergie dissipée/centre réactionnel du PSII
E	Taux de transpiration
EPA	US Environmental Protection Agency
EPSP	5-enolpyruvoylshikimate 3-phosphate
EPSPS	5-enolpyruvoylshikimate 3-phosphate synthase

ET <sub>O</sub> /RC	Quantité d'énergie transférée dans la chaîne de transport d'électrons/centre réactionnel du PSII
ETR	Taux de transport d'électrons
Fd	Ferrédoxine
Fe	Fer
FeS	Protéines fer-soufre
F <sub>M</sub>	Fluorescence maximale
F <sub>O</sub>	Fluorescence initiale à 50µs
F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	Rendement quantique
F <sub>V</sub> '/F <sub>M</sub> '	Rendement quantique opérationnel
GPX	Guaiacol peroxidase
GR	Résistant au glyphosate
Gs	Conductance stomatique
H <sup>+</sup>	Proton (atome d'hydrogène)
H'	Indice de Shannon
H <sub>2</sub> O	Eau
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
HSM	High Salt Medium
IPA	Sel d'isopropylamine de glyphosate
K <sub>oc</sub>	Coefficient de partage octanol/eau
LOAEL	Concentration la plus faible à laquelle un effet toxique est observée
MDA	Malondialdéhyde
MDDEP	Ministère du développement durable, de l'environnement, de la faune et des parcs
Mg	Magnésium
Mn	Manganèse
Mn <sub>4</sub> Ca	Complexe de dégagement d'oxygène
M <sub>O</sub>	Taux net de fermeture du PSII
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NOAEL	Concentration la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est observable

NPQ	Quenching non-photochimique
O <sub>2</sub>	Dioxygène
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anion superoxyde
O-J-I-P	Transitions de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne (O=F <sub>50μs</sub> , P=F <sub>2ms</sub> , I=F <sub>30ms</sub> et P=F <sub>M</sub> )
Φ <sub>PSII</sub>	Rendement photochimique du PSII
P680	Centre réactionnel du photosystème II
P680*	Centre réactionnel excité du photosystème II
P700	Centre réactionnel du photosystème I
P700*	Centre réactionnel excité du photosystème I
PEA	Plant Efficiency Analyser
PEP	Phosphoenolpyruvate
pH	Potentiel hydrogène
Pi	Phosphate inorganique
pK <sub>a</sub>	Constante d'acidité
POEA	Polyoxyéthylène amine
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Q <sub>A</sub>	Plastoquinone A
Q <sub>A</sub> <sup>-</sup>	Plastoquinone A réduite
Q <sub>B</sub>	Plastoquinone B
qP	Quenching photochimique
<i>r</i>	Coefficient de corrélation de Pearson
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
Rubisco	Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase oxygénase
RuBP	Ribulose-1,5-biphosphate
S3P	Shikimate 3-phosphate
SABRE	<i>Salix</i> en Agriculture pour des Bandes Riveraines Énergétiques
SOD	Superoxide dismutase
TR <sub>O</sub> /RC	Quantité d'énergie transférée/centre réactionnel du PSII
μ	Taux de croissance



xiv

UV

Ultraviolets

$V_J$

Nombre de centres réactionnels fermés à 2ms

$Y_z$

Résidu tyrosine de la protéine D1 (aussi appelé Tyr 161)

## RÉSUMÉ

Les herbicides à base de glyphosate sont les plus vendus dans le monde, souvent employés de pair avec les cultures transgéniques de maïs et de soya. Les suivis de la qualité des eaux en milieu agricole effectués au Québec, en Ontario, en France et aux États-Unis, indiquent que la fréquence de détection du glyphosate dans ces cours d'eau est en croissance, ce qui peut affecter le phytoplancton. Dans le but de déterminer les effets du glyphosate sur les algues et les cyanobactéries, deux séries d'expérience ont été menées. Tout d'abord, des bioessais algaux monospécifiques ont été effectués en laboratoire, avec des espèces provenant de trois groupes taxonomiques (cyanobactérie, chlorophyte et cryptophyte), exposées à un herbicide à base de glyphosate (Factor 540<sup>®</sup>) pendant 48 heures. Des courbes dose-réponse ont ensuite été dressées, démontrant une réduction de la croissance à partir de 50 µg l<sup>-1</sup>, alors que le rendement photosynthétique fut diminué de 10% à partir d'une concentration de 200 µg l<sup>-1</sup>. La deuxième série d'expériences fut effectuée sur une communauté naturelle de phytoplancton prélevée dans un ruisseau en milieu agricole dans la plaine du St-Laurent (Ruisseau Dumontier, Boisbriand, Québec), puis exposée au même herbicide en laboratoire. Les résultats ont démontré une diminution de 30% de l'abondance des espèces de la communauté à partir de 50 µg l<sup>-1</sup> et de 40% de la biomasse à partir de 500 µg l<sup>-1</sup>, ainsi que de sa diversité spécifique, tel que démontré par la diminution de l'indice de Shannon suivant l'augmentation des concentrations d'herbicide. La composition des espèces dominantes de la communauté (>5% de la biomasse totale) fut modifiée à partir d'une concentration de 5 µg l<sup>-1</sup>. Cette recherche met en évidence l'importance de prendre en compte les différences interspécifiques dans l'évaluation de la toxicité d'un herbicide à base de glyphosate sur les algues et cyanobactéries. De plus, elle démontre des effets de cet herbicide sur la structure des communautés de phytoplancton à des concentrations pouvant être retrouvées en milieu naturel.

Mots clés : herbicide, écotoxicologie aquatique, bioessais algaux, biomarqueurs, physiologie, diversité spécifique



## CHAPITRE I

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

#### 1.1 La problématique

L'apport de fertilisants, de pesticides et de matières organiques vers les cours d'eau est une problématique environnementale liée aux pratiques agricoles, et la préservation des écosystèmes aquatiques est un défi auquel font face tous les pays pratiquant une agriculture à grande échelle (Organisation de Coopération et de Développement Économique, 2008). Les conséquences engendrées par cette pollution diffuse sont nombreuses, tant au niveau environnemental qu'économique. Parmi celles-ci, notons l'eutrophisation des cours d'eau, l'augmentation des coûts de filtration de l'eau potable, la perte du sol organique, la perte des usages reliés à l'eau, ainsi que les effets nocifs de ces polluants sur la santé des écosystèmes et sur la santé humaine. De plus, sur les dix plus grandes sources de pollution à l'échelle mondiale, l'Institut Blacksmith classe, respectivement, en troisième et en dixième position, la pollution causée par les pesticides employés en agriculture et celle due à la fabrication et à l'entreposage de ces pesticides (Harris et McCartor, 2011).

Ces dernières années sont marquées par l'utilisation du glyphosate ou N-(phosphonométhyl)glycine, un herbicide systémique et non sélectif synthétisé en 1950 par le chimiste suisse Henri Martin (Franz *et al.*, 1997). Sa propriété désherbante fut découverte en 1970 et le premier herbicide à base de glyphosate, aussi connu sous son nom de commercialisation, le Roundup<sup>®</sup>, a été mis sur le marché dès 1974 par la compagnie américaine Monsanto. L'utilisation de cet herbicide non sélectif a littéralement explosée suite au développement des semences transgéniques résistantes au glyphosate "Roundup ready<sup>®</sup>" toujours par la compagnie Monsanto, pour le soya et le maïs, au milieu des années 1990

(Franz *et al.*, 1997; Duke et Powles, 2008). À l'heure actuelle, 80% des cultures transgéniques mondiales sont des cultures résistantes au glyphosate et le volume de glyphosate vendu, sous forme de divers produits commerciaux dont il est l'ingrédient actif, représente 60% du volume total des herbicides vendus dans le monde (Duke et Powles, 2008). Au Québec en 2012, 62,5% du maïs-grain et 49% du soya ensemencé était génétiquement modifié (Statistique Canada, 2011). Les pesticides du groupe des acides phosphoniques sont les pesticides les plus vendus au Québec selon les données les plus récentes de 2009, le glyphosate en tête avec une proportion de 35,2% des ventes totales, équivalente à 1 402 762 kg. Il s'agit d'une croissance de 670%, par rapport à l'année 1992 (Gorse et Balg, 2012) et les prévisions indiquent que l'utilisation des herbicides à base de glyphosate est toujours en croissance (Gorse et Rivard, 2011).

Parallèlement à l'augmentation de l'adoption des cultures transgéniques résistantes au glyphosate et à l'utilisation des herbicides à base de glyphosate en agriculture, sa fréquence de détection dans l'environnement aquatique a aussi significativement augmenté. En effet, le glyphosate est retrouvé dans 90,6% des échantillons d'eau prélevés par le Ministère du développement durable, de l'environnement et des parcs (MDDEP) du Québec, dans quatre rivières de milieu agricole à l'étude en 2010, par rapport à une fréquence de détection de 76,2% en 2008. Les concentrations maximales varient entre 2,7 et 29  $\mu\text{g l}^{-1}$ , pour ces quatre rivières à l'étude, soit les rivières Chibouet (bassin versant de la rivière Yamaska), des Hurons (bassin versant de la rivière Richelieu), Saint-Régis (affluent du fleuve Saint-Laurent) et Saint-Zéphirin (bassin versant de la rivière Nicolet) (Giroux et Pelletier, 2012). Des suivis des eaux de surface du sud de l'Ontario effectué sur une trentaine de sites différents, rivières, ruisseaux, fossés de drainage agricoles et milieux humides, font état d'une fréquence de détection du glyphosate de 50%, avec une concentration maximale de 40,8  $\mu\text{g l}^{-1}$  pour l'année 2005 (Struger *et al.*, 2008). Aux États-Unis, pour un suivi de plus de 2000 sites d'échantillonnage des eaux de surface et de l'eau du sol, effectué entre 2001 et 2006, la fréquence de détection a varié entre 7,4 et 50%, avec des concentrations maximales de glyphosate situées entre 0,33 et 99  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Scribner *et al.*, 2007). La norme canadienne de protection de la vie aquatique chronique, recommandée par le Conseil des ministres canadiens de l'environnement (CCME) en 2008, est d'une concentration maximale de 65  $\mu\text{g}$

l<sup>-1</sup>, alors que la concentration maximale acceptable pour l'eau potable est de 280 µg l<sup>-1</sup> (CCME, 2008). Les concentrations environnementales retrouvées au Québec sont donc inférieures aux normes canadiennes.

## 1.2 Le glyphosate dans l'environnement

Les herbicides à base de glyphosate sont classés dans le groupement chimique des acides phosphoniques, caractérisé par la liaison de l'atome de phosphore avec au moins un atome de carbone ou d'hydrogène (Dion, 2007). Le glyphosate est utilisé comme ingrédient actif sous plusieurs formes chimiques, généralement sous forme de sel : sel d'isopropylamine (IPA), de diammonium, de monoammonium, de potassium, de triméthylsulfonium ou de diméthylamine (Gorse et Rivard, 2011). L'IPA est la forme la plus couramment employée et on la retrouve dans 53 produits herbicides commerciaux, sur un total de 56 produits homologués par l'EPA en 1993 (EPA, 1993). Au Canada, en 2012, 153 formulations commerciales d'herbicides à base de glyphosate étaient enregistrées et autorisées pour la mise en marché, dont la majorité contenaient du glyphosate sous forme d'IPA (CCME, 2012). Outre l'ingrédient actif, ces produits contiennent aussi des surfactants qui facilitent l'adhésion sur les feuilles, ainsi que la pénétration de l'herbicide à travers la cuticule. Le polyoxyéthylène amine (POEA) est le surfactant le plus souvent employé et il a comme effet d'augmenter la toxicité du glyphosate sur les organismes vivants non ciblés (Tsui et Chu, 2003; Giesy *et al.*, 2000). Suite à l'application foliaire, le glyphosate est absorbé par la plante de manière passive ou active, avec un taux d'absorption se situant entre 45% et 65% de la dose initiale appliquée, puis distribué, via le phloème, vers les jeunes tiges et les racines (Hetherington *et al.*, 1999). La fraction du glyphosate pulvérisé non absorbé par les plantes se lie fortement aux particules de sol, puis est dégradée, en partie, en acide aminométhylphosphonique (AMPA) par les microorganismes du sol (Giesy *et al.*, 2000). La dégradation du glyphosate en son métabolite semblerait aussi se produire à l'intérieur des végétaux, par un processus peu connu (Ding *et al.*, 2011). L'AMPA est reconnu pour avoir des propriétés phytotoxiques, allant même jusqu'à affecter les plants de soya génétiquement modifié, ceux-ci étant résistants au glyphosate mais non à l'AMPA. Parmi les effets observés de l'AMPA, on note une diminution du contenu en chlorophylle et une réduction du poids frais des tiges de soya transgénique *Glycine max* (L.) Merr. (Reddy *et al.*, 2004). En général,



la formulation commerciale, le POEA et l'AMPA démontrent plus de toxicité sur les organismes vivants que le glyphosate seul ou sous forme d'IPA (Giesy *et al*, 2000). En effet, toutes les études de toxicité consultées, comparant l'effet du glyphosate seul avec l'effet des formulations commerciales des herbicides à base de glyphosate, ont démontré que les formulations commerciales étaient plus toxiques, et ce, pour les poissons, les invertébrés aquatiques (Folmar *et al*, 1979), les amphibiens (Perkins *et al*, 2000), le phytoplancton (Tsui et Chu, 2003; Lipok *et al*, 2010) et les lignées cellulaires humaines (Benachour et Séralini, 2009; Gasnier *et al*, 2009) (voir tableau A.1). D'ailleurs, le CCME mentionne qu'il est important de ne pas sous-estimer les risques liés aux effets des herbicides à base de glyphosate sur les organismes aquatiques, surtout en ce qui concerne les formulations commerciales contenant le surfactant POEA (CCME, 2012). En général, l'évaluation du risque toxicologique du glyphosate ne prend pas en compte les différents mélanges commerciaux. Cette recherche touche donc aux herbicides à base de glyphosate employés en agriculture et non simplement sur le glyphosate pur.

**Tableau 1.1 Propriétés physico-chimiques du glyphosate (Santé Canada, 1987; Giesy *et al*, 2000; CCME, 2008)**

<b>Noms</b>	Glyphosate Acide N-(phosphonométhyl)glycine Acide (phosphonométhylamino)-2 acétique Sel d'isopropylamine (IPA)
<b>Formule chimique</b>	$C_3H_8NO_5P$ (acide) $C_3H_9N.C_3H_8NO_5P$ (IPA)
<b>Poids moléculaire</b>	169.09 (acide) 227.2 (IPA)
<b>Solubilité dans l'eau</b>	10 000 – 15 700 mg/l à 25°C
<b>Pka (4)</b>	pH: 0.8; 2.3; 6.0; 11.0
<b>Demi-vie (jours)</b>	Glyphosate: 1.2 à 197.3 (sol), 7 à 14 (cau) AMPA: 76 à 240 (sol), 7 à 14 (eau) POEA: 7 à 14 (sol), 21-42 (cau)

Les demi-vies du glyphosate, de l'AMPA et du POEA dans l'environnement (sol et eau) sont relativement courtes, allant de 1 à 240 jours selon les différentes études (Giesy *et al.*, 2000), par comparaison avec les polluants organiques persistants comme le DDT ou les dioxines, dont les demi-vies se calculent en termes d'années. Par contre, des études récentes semblent indiquer que la dégradation du glyphosate dans les sols et dans les eaux de surface pourrait être plus lente selon les caractéristiques physico-chimiques de l'environnement, ainsi qu'en fonction du climat. En effet, Borggaard et Gimsing (2008) ont trouvé des demi-vies de cent à mille jours, pour la dégradation du glyphosate dans des sols de surface, au Danemark. Des résultats semblables ont été vérifiés par Laitinen *et al.* (2009) pour les sols de surface en milieu boréal, où des résidus de glyphosate ont été retrouvés vingt mois après l'application.

### 1.3 Évaluation du risque toxicologique

Les organismes vivants, terrestres et aquatiques, peuvent être exposés au glyphosate via différentes voies, que ce soit par contact direct lors de l'application au champ, dans l'eau, dans le sol ou par le régime alimentaire. Giesy *et al.* (2000) ont ciblés de nombreux organismes étant potentiellement à risque d'exposition au glyphosate: les microorganismes aquatiques et terrestres, les invertébrés aquatiques et terrestres, les macrophytes et plantes terrestres non ciblées, les amphibiens, les poissons, les arthropodes, les oiseaux et les mammifères. Plusieurs études toxicologiques font état des effets des herbicides à base de glyphosate sur les organismes vivants en milieu aquatique, qui sont particulièrement sensibles. Chez les végétaux, on observe un effet sur le métabolisme des acides aminés aromatiques (Wang, 2001; Dewick, 1998), une diminution de la croissance (Tsui et Chu, 2003; Wong, 2000) et du rendement photosynthétique (Wong, 2000; Zobiolo *et al.*, 2010a, 2010b, 2010c, 2012), une diminution de l'absorption des macros et micronutriments (Zobiolo *et al.*, 2011; Eker *et al.*, 2006) et du contenu en chlorophylle (Zobiolo *et al.*, 2011). Même si le glyphosate agit sur une voie métabolique spécifique aux végétaux, il peut aussi affecter les animaux, tel que démontré par plusieurs études écotoxicologiques. Par exemple, il inhibe la croissance des crustacés (Tsui et Chu, 2003), diminue le pourcentage d'éclosion des œufs chez la truite arc-en-ciel (Folmar *et al.*, 1979), cause des lésions rénales et cervicales, de même que des dommages aux branchies et au foie chez le tilapia du Nil en phase juvénile (Ayoola, 2008) et du stress oxydatif chez le poisson *Prochilodus lineatus* (Modesto et Martínez, 2010) et induit



des changements morphologiques sur les têtards de grenouilles des bois (*Rana sylvatica*) et léopard (*Rana pipiens*) (Relyea, 2012). Plusieurs études animales classiques ont été réalisées dans le but d'évaluer les risques relatifs à l'exposition au glyphosate. Tous animaux confondus, ces études ont démontrées que le glyphosate avait plusieurs effets nocifs sur les mammifères. Par exemple, on observe un épaississement de la peau, des lésions cutanées et une augmentation du poids des testicules chez le lapin (Couture *et al.*, 1995), une perturbation de la glande thyroïde chez les rats femelles et des effets sur les testicules chez les mâles, ainsi que des anomalies fœtales chez le rat et le lapin (Santé Canada, 1987). Certaines études indiquent aussi des effets des herbicides à base de glyphosate sur les cellules humaines, notamment par l'induction du dysfonctionnement du cycle de régulation cellulaire (Marc *et al.*, 2004; Benachour et Séralini, 2009) ou par la perturbation endocrinienne (Gasnier *et al.*, 2009).

#### 1.4 Les bioessais algaux

Les bioessais algaux sont employés en écotoxicologie comme un outil visant à mesurer les effets phytotoxiques d'un produit chimique, dans le but de prédire et d'éviter des effets néfastes sur des végétaux aquatiques non ciblés. Ce type de test s'inscrit dans une approche de l'évaluation et de la gestion du risque (suivi environnemental) (Lewis, 1995; Giesy *et al.*, 2000). Ils sont avantageux car peu coûteux, rapides et sensibles. De plus, il est possible de mesurer de nombreux paramètres lors de ces bioessais, tels que la survie, la croissance, la reproduction, la motilité, etc. Les résultats de ces tests sont souvent exprimés en terme de concentration effective médiane (CE<sub>50</sub>), qui est la concentration du produit causant 50% d'effet sur une population donnée (voir tableau 1.2, pour le glyphosate), obtenue à l'aide d'une courbe dose-réponse. D'autres valeurs peuvent aussi être employées: la concentration la plus élevée pour laquelle aucun effet toxique n'est observable (NOAEL), la concentration la plus faible à laquelle un effet toxique est observée (LOAEL), etc. (Giesy *et al.*, 2000).

Dans le cadre de cette recherche, une approche à l'échelle de la communauté sera employée, de manière complémentaire aux bioessais monospécifiques, dans le but de se rapprocher des conditions environnementales réelles. En effet, la toxicité d'un pesticide peut varier en fonction des organismes tests choisis, ce qui peut être dû à des différences au niveau de la physiologie des espèces ou des conditions expérimentales (milieux de culture employés,

luminosité, température, disponibilité des nutriments, etc.). Les différences de sensibilité interspécifiques jouent un rôle important dans la composition des espèces des communautés vivants dans un milieu contaminé et il est important de le considérer (Bérard *et al.*, 1999 ; De Lorenzo *et al.*, 1999). De plus, le milieu naturel contient souvent plusieurs contaminants et métabolites secondaires pouvant agir en synergie avec le polluant testé, en augmentant, neutralisant ou diminuant sa toxicité pour certains organismes (Sura *et al.*, 2012).

**Tableau 1.2 Valeurs de CE<sub>50</sub> répertoriées dans la littérature exprimant les effets du glyphosate sous différentes formes chimiques, sur la croissance du phytoplancton**

Organismes	Produits	[glyphosate]	Références
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Roundup transorb® HC herbicide liquide	0,124 mg l <sup>-1</sup>	Monsanto Canada (2009)
Algues vertes	N-(phosphonométhyl) glycine	7 - 4000 µg ml <sup>-1</sup>	Choi <i>et al.</i> (2012)
Algues	Sel d'isopropylamine (IPA)	72.9 mg l <sup>-1</sup>	Commission européenne (2002)
	Glyphosate-trimésium	0.72 mg l <sup>-1</sup>	
	Acide N-(phosphonométhyl) glycine	0.64 mg l <sup>-1</sup>	
Algues	Acide N-(phosphonométhyl) glycine	2 - 600 mg l <sup>-1</sup>	Durkin (2011)
<i>Selenastrum capricornutum</i>	Roundup®	2.1 - 8 mg l <sup>-1</sup>	Giesy <i>et al.</i> (2000)
Cyanobactéries, diatomées, algues vertes	Acide N-(phosphonométhyl) glycine	2 - 590 mg l <sup>-1</sup>	

Des études effectuées à l'échelle de la communauté ont démontré que certains polluants avaient des effets sur le phytoplancton qui n'étaient pas observables lors de tests monospécifiques. Par exemple, Bérard *et al.* (1999), ont observé que, lorsque soumise à l'atrazine, la croissance de la cyanobactérie *Oscillatoria limnetica* était diminuée au

printemps et stimulée pendant l'été lorsqu'elle se trouvait dans un assemblage de phytoplancton, alors que cet effet de stimulation n'était pas présent lors de tests monospécifiques. Ils en ont conclu que la sensibilité de la cyanobactérie à l'atrazine était influencée par la température, mais aussi par les interactions avec les autres espèces dans la communauté. En effet, l'atrazine n'a eu aucun effet sur la croissance des diatomées au printemps, celles-ci étant mieux adaptées aux températures plus froides, alors que les cyanobactéries ont presque disparues, étant déjà désavantagées par la température. Concernant le glyphosate, Stachowski-Haberkorn *et al.* (2008) ont démontré que le Roundup® pouvait induire des perturbations au niveau de la structure de la communauté des microorganismes en milieu marin, à des concentrations susceptibles de se retrouver dans l'environnement (1 et 10  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), notamment en diminuant le nombre d'espèces présentes. Dans une autre étude, Vera *et al.* (2010) ont démontré des perturbations au niveau de la structure des communautés de périphyton dans des milieux d'eau douce en Argentine, la colonisation par les cyanobactéries étant favorisée par rapport aux autres populations, à des concentrations de Roundup® de 8  $\text{mg l}^{-1}$ .

### 1.5 Le mode d'action du glyphosate

Le glyphosate est un inhibiteur compétitif de l'enzyme 5-enolpyruvoylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS), qui est impliquée dans la voie de synthèse de l'acide shikimique (Dewick, 1998; Marzabadi *et al.*, 1996; Tzin et Galili, 2010). Cette voie métabolique est l'une des voies les plus importantes chez les végétaux et 20% du carbone fixé par les plantes y est acheminée (Herrmann, 1995). L'enzyme EPSPS catalyse une réaction de transfert de la portion carboxyvinyle du substrat phosphoenolpyruvate (PEP) vers la région 5-OH du shikimate 3-phosphate (S3P). Les produits formés sont le 5-enolpyruvoylshikimate 3-phosphate (EPSP) et du phosphate inorganique (Pi). Une inhibition de l'activité d'EPSPS, par la formation d'un complexe glyphosate-S3P-EPSPS, cause une accumulation du substrat dans les chloroplastes, ce qui est une indication de l'exposition au glyphosate (Marzabadi *et al.*, 1996; Dewick, 1998; Fedtke et Duke, 2005; Herrmann, 1995). La voie de l'acide shikimique mène à la biosynthèse des acides aminés aromatiques, tryptophane, tyrosine et phénylalanine, ainsi qu'à la synthèse de métabolites secondaires tels que la lignine, les quinones ou d'autres composés impliqués

dans la défense des végétaux contre les rayons UV et les prédateurs, insectes ou herbivores (Marzabadi *et al.*, 1996; Tzin et Galili, 2010; Dewick, 1998).

Outre son effet sur la voie de l'acide shikimique, le glyphosate affecte aussi la photosynthèse et la nutrition chez les plantes. Tout d'abord, il a été démontré que l'exposition au glyphosate pouvait diminuer le contenu en chlorophylle *a* des plantes (Muñoz-Rueda *et al.*, 1986; Zobiolo *et al.*, 2011), ainsi que le rendement photosynthétique (Choi *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2012; Mateos-Naranjo *et al.*, 2009; Muñoz-Rueda *et al.*, 1986; Vivancos *et al.*, 2011; Yanniccari *et al.*, 2012; Zobiolo *et al.*, 2010) (voir tableau 1.3). De plus, le glyphosate a aussi des effets sur le métabolisme du carbone puisque, suite à son exposition, le contenu intracellulaire en CO<sub>2</sub> est diminué (Mateos-Naranjo *et al.*, 2009), de même que le contenu en ribulose-1,5-biphosphate (RuBP) et l'activité de la ribulose 1,5-biphosphate carboxylase oxygénase (Rubisco) (Servaites *et al.*, 1987). Il semblerait que le glyphosate intervienne aussi au niveau du métabolisme et de la translocation des sucres (Servaites *et al.*, 1987; Orcaay *et al.*, 2012). Yannicari *et al.* (2012) ont démontré une plus grande accumulation des sucres dans les feuilles de la poacée *Lolium perenne*, après une exposition au glyphosate.

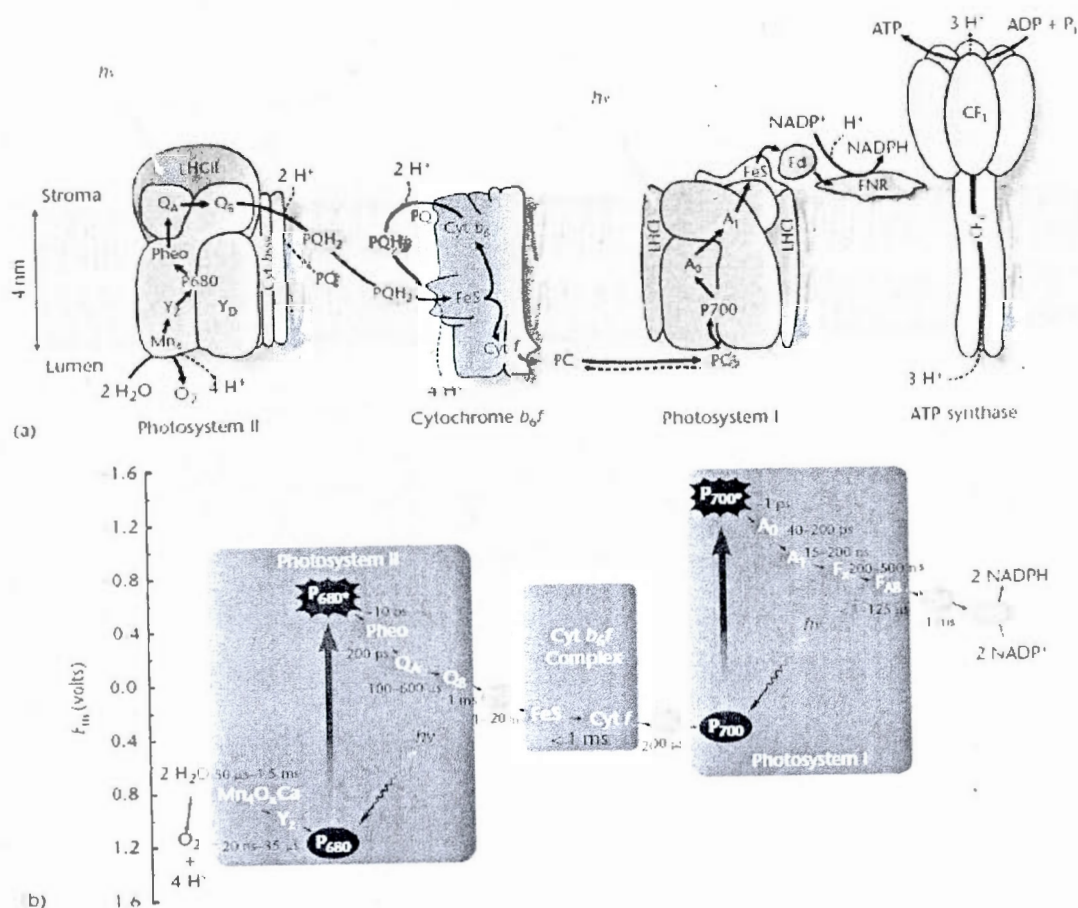
De plus, la nutrition chez les plantes est perturbée par le glyphosate à cause de sa capacité à former des complexes peu solubles avec les cations, à l'intérieur des tissus végétaux. Cakmak *et al.* (2009) ont démontré que le glyphosate pouvait réduire le contenu en calcium (Ca<sup>2+</sup>), magnésium (Mg<sup>2+</sup>) et manganèse (Mn<sup>2+</sup>) dans les feuilles de plants de soya. Le contenu en fer (Fe<sup>2+</sup>), en Ca, en Mg et en Mn était aussi réduit dans les graines. Ces éléments sont des cofacteurs essentiels à la synthèse de plusieurs composantes du système photosynthétique. Par exemple, le Mg est un cofacteur nécessaire à la synthèse de la chlorophylle; le Mn est impliqué dans la photolyse de l'eau au niveau du photosystème II (PSII) et le Fe est un composant de la ferrédoxine (Fd), une protéine impliquée dans la chaîne de transport des électrons au niveau du photosystème I (PSI) (Raven *et al.*, 2007) (voir figure 1.1).

## 1.6 La photosynthèse

Puisque le glyphosate peut affecter la photosynthèse chez les végétaux, par des mécanismes plus ou moins connus, voici un rappel des processus photosynthétiques. La photosynthèse est le processus métabolique majeur chez les organismes autotrophes, qui vise à fixer le carbone



atmosphérique et à le transformer en sucres, nécessaires à la croissance. La figure 1.1 représente, de manière schématisée, les réactions photochimiques ayant lieu sur les membranes des thylakoïdes, dans les chloroplastes. L'énergie lumineuse y est captée par un complexe d'antennes collectrices de lumière, formé principalement de pigments photosynthétiques, chlorophylle *a* et *b*, caroténoïdes, phycobilisomes, etc., qui varient selon les espèces végétales. Cette énergie lumineuse est alors transférée aux centres réactionnels des photosystèmes I (PSI), le P700 et II (PSII), le P680, qui deviennent alors excités (P700\* et P680\*) (Govindjee *et al.*, 2010). Le PSII est le complexe initiateur du transport d'électrons et effectue aussi la photolyse de l'eau, via le complexe de dégagement d'oxygène, formé de quatre ions de manganèse et d'un ion de calcium ( $Mn_4Ca$ ). Ce complexe a pour fonction de fractionner les molécules d'eau ( $2 H_2O$ ) en oxygène ( $O_2$ ) et en protons ( $4 H^+$ ) (Yano *et al.*, 2006; Govindjee *et al.*, 2010). Les électrons sont alors transférés du complexe  $Mn_4Ca$  vers un résidu tyrosine ( $Y_z$ ), puis vers P680 et enfin vers les accepteurs primaires d'électrons, les plastoquinones A ( $Q_A$ ) et B ( $Q_B$ ). À partir du PSII, les électrons sont ensuite transférés vers le complexe du cytochrome *bf*, puis vers le PSI. Les protons relâchés dans le lumen par le PSII et le cytochrome *bf* seront employés par la pompe à protons ATP synthase pour la production d'adénosine triphosphate (ATP). Des molécules de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) sont aussi synthétisées dans le lumen du thylakoïde et ces deux molécules, ATP et NADPH, fourniront l'énergie nécessaire pour la fixation du carbone et la synthèse des sucres (Raven *et al.*, 2007; Govindjee *et al.*, 2010).

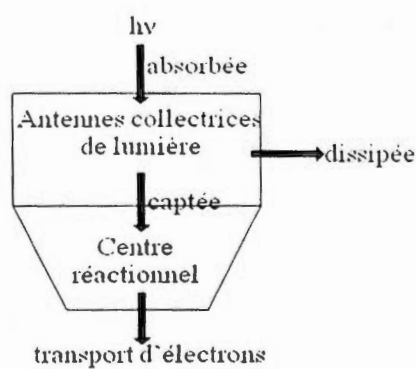


**Figure 1.1** a) Représentation schématique des différents composants de la chaîne de transport d'électrons b) Schéma en Z représentant les différents états énergétiques de la chaîne de transport d'électrons (Tirée de Govindjee *et al.*, 2010)

### 1.7 La fluorescence chlorophyllienne

Les flux d'énergie transitant par le PSII sont facilement quantifiables grâce à un modèle développé par Force *et al.* (2003) (figure 1.2) et l'utilisation d'un appareil appelé le «*Plant efficiency analyser*» (Handy PEA, Hansatech Instruments LTD. England). Le modèle des flux d'énergie décrit la quantité d'énergie lumineuse absorbée par le complexe antennaire, dissipée par la chaleur ou la fluorescence, captée par le centre réactionnel du PSII et transférée dans la chaîne de transport d'électrons. Cette capacité photochimique du PSII est quantifiée à partir de la cinétique O-J-I-P, mesurée par le PEA. Avant la mesure, les plantes

subissent une période d'adaptation en absence de lumière, afin de s'assurer que toutes les plastoquinones des centres réactionnels sont dans un état non-réduit (ouvert), donc à leur pleine capacité pour effectuer la photochimie. Il s'agit du niveau initial de fluorescence ( $F_0$ ). Ensuite, l'échantillon est illuminé avec une lumière saturante de haute intensité ( $3500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), ce qui réduit toutes les plastoquinones. Il s'agit du niveau maximal de fluorescence ( $F_M$ ). Les différents paramètres d'absorption, de dissipation, de captage et de transport d'électrons sont calculés à partir de cette cinétique (tableau 2.2).



**Figure 1.2** Modèle des flux d'énergie transitant par le PSII (Basée sur figure 1 dans Force *et al.*, 2003).

Depuis plusieurs années, la fluorescence chlorophyllienne est employée pour étudier les effets de différents stress environnementaux sur la physiologie des plantes, tels que les effets de la température, du stress lumineux ou des métaux (Maxwell et Johnson, 2000; Barbagallo *et al.*, 2003; Force *et al.*, 2003; Oxborough, 2004; Juneau *et al.*, 2007; Schreiber *et al.*, 2007; Roháček *et al.*, 2008; Stirbet et Govindjee, 2011). Il s'agit d'un outil sensible pouvant être employé pour mieux comprendre la toxicité des herbicides sur l'appareil photosynthétique, ainsi que pour effectuer des suivis de la contamination du milieu aquatique par les herbicides (Juneau *et al.*, 2007). Tel que décrit par plusieurs auteurs, le glyphosate peut réduire le rendement photosynthétique chez le phytoplancton (tableau 1.3). Cette diminution du rendement peut être expliquée par des effets sur de nombreux composants de l'appareil photosynthétique, que ce soit au niveau des pigments photosynthétiques, du complexe de dégagement de l'oxygène ( $\text{Mn}_4\text{Ca}$ ), de la protéine D1, de la tyrosine  $T_Z$ , des protéines fer-

soufre (FeS) ou de la ferrédoxine (Fd). Les effets du glyphosate sur les flux d'énergie du PSII chez les végétaux sont très peu connus et la fluorescence chlorophyllienne sera employée comme outil de recherche pour mieux en comprendre les effets.

**Tableau 1.3 Les effets du glyphosate sur la photosynthèse chez les végétaux**

Organismes	[glyphosate]	Effets sur la photosynthèse	Références
<i>Spartina densiflora</i> (Poacée)	3600, 5400 et 7200 ga.i.ha <sup>-1</sup>	↓ F <sub>v</sub> /F <sub>M</sub> , Φ <sub>PSII</sub> , qP, taux photosynthétique net (A), conductance stomatique (Gs), contenu en chlorophylle a, b et caroténoïdes	Mateos- Naranjo <i>et al.</i> (2009)
<i>Medicago sativa</i> et <i>Trifolium pratense</i> (Fabacées)	0.15, 1.5 et 15 mM	↓ contenu en chlorophylle a, b et caroténoïdes, conductance stomatique, activité de PSII et PSI (μmol O <sub>2</sub> mg Chl <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) ↑ ratio de chlorophylle a/b,	Muñoz- Rueda <i>et al.</i> (1986)
Soya <i>Glycine max</i> (sensible au glyphosate)	1%	↓ qP, F <sub>v</sub> /F <sub>M</sub> , assimilation de CO <sub>2</sub> (μmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ) ↑ NPQ	Vivancos <i>et al.</i> (2011)
<i>Imperata cylindrical</i> L. (Poacée)	0.3, 0.5, 1.0 et 2%	↓ contenu en chlorophylle a et b, ETR, taux photosynthétique net (P <sub>N</sub> ) et rendement, F <sub>v</sub> '/F <sub>M</sub> ' ↑ NPQ, taux de transpiration (E)	Huang <i>et al.</i> (2012)
<i>Lolium perenne</i> (Poacée)	Sensible (non-GR)	0.7, 1.4 et 2.8 kg a.i.ha <sup>-1</sup>	Yannicari <i>et al.</i> (2012)
	Résistant (GR)		
Phytoplancton (5 espèces)	15 à 75 μg ml <sup>-1</sup>	↓ F <sub>v</sub> /F <sub>M</sub>	Choi <i>et al.</i> (2012)
Soya résistant au glyphosate	800, 1,200 et 2,400 g a.e.ha <sup>-1</sup>	↓ F <sub>v</sub> /F <sub>M</sub> , taux photosynthétique net (A), conductance stomatique (gs), taux de transpiration (E), ETR, F <sub>v</sub> '/F <sub>M</sub> ', qP	Zobiolo <i>et al.</i> (2010)



### 1.8 Objectifs et hypothèses de recherche

Ce projet de recherche a été réalisé dans le cadre du projet CRSNG-stratégique SABRE, dont l'acronyme signifie *Salix* en Agriculture pour des Bandes Riveraines Énergétiques. L'équipe du projet SABRE travaille, sous la supervision des quatre chercheurs principaux, Marc Lucotte, Philippe Juneau, Michel Labrecque et Laurent Lepage, sur la pollution agricole diffuse, l'érosion des terres agricoles, l'intégrité du milieu aquatique et l'acceptabilité socio-économique d'une bande riveraine composée de saules arbustifs à croissance rapide. Les objectifs généraux de ce projet spécifique sont en lien avec le volet intégrité du milieu aquatique du projet SABRE et visent à mieux comprendre les effets du glyphosate sur le phytoplancton. Pour ce faire, deux séries d'expériences ont été menées. La première est une suite de bioessais monospécifiques, où plusieurs espèces d'algues et de cyanobactéries ont été exposées à une gamme de concentrations de glyphosate, variant entre 10 et 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  (objectif 1). L'utilisation de concentrations élevées ( $>100 \mu\text{g l}^{-1}$ ) fut effectuée dans le but de dresser des courbes dose-réponse théoriques. Pour la deuxième série d'expériences, de faibles concentrations (1 et 5  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) furent ajoutées à cette gamme de concentrations de glyphosate et cette fois c'est la communauté de phytoplancton d'un ruisseau en milieu agricole qui fut exposée au glyphosate (objectif 2). Ces objectifs correspondent aux chapitres II et III de ce mémoire et seront présenté sous la forme de deux articles scientifiques complémentaires.

*Objectif 1* : Étudier les effets du glyphosate sur la croissance et l'activité photosynthétique des algues et des cyanobactéries.

L'implication du glyphosate dans la voie de l'acide shikimique est bien connue. Par contre, les effets de l'exposition des plantes au glyphosate sont nombreux et variés. Si certains de ces effets sont directement liés avec la perturbation de la voie de l'acide shikimique, tels que les effets sur le métabolisme des acides aminés aromatiques et sur la croissance, d'autres, notamment la diminution du contenu en chlorophylle et du rendement photosynthétique semblent, quant à eux, peu liés ou indirectement liés avec cette voie métabolique.

*Hypothèse 1* : Le glyphosate exerce une toxicité sur les algues et les cyanobactéries en diminuant leur croissance et leur rendement photosynthétique.

*1.1* : Le taux de croissance sera le paramètre le plus affecté par l'exposition à un herbicide à base de glyphosate à cause de l'effet inhibiteur du glyphosate sur la synthèse des acides aminés aromatiques, donc des protéines nécessaires à la croissance.

*1.2* : Le rendement photosynthétique sera moins affecté que la croissance car les effets du glyphosate sur la photosynthèse sont indirects.

Le glyphosate interfère avec la voie de l'acide shikimique, réduisant la synthèse des acides aminés aromatiques : tryptophane, tyrosine et phénylalanine (Marzabadi *et al*, 1996; Dewick, 1998; Tzin et Galili, 2010). Ces acides aminés se retrouvent dans la composition de protéines nécessaires à la croissance et aux processus photosynthétiques. Par exemple, la protéine D1, composante essentielle du photosystème II (PSII), contient un résidu tyrosine qui est activement impliqué dans les réactions de réduction de la chaîne de transport d'électrons (Dwivedi et Bhardwaj, 1995) (figure 1.1). Un déficit en tyrosine, causé par l'action du glyphosate dans la voie de l'acide shikimique, pourrait mener à une diminution de la synthèse de la protéine D1, se traduisant par une baisse de la croissance et du rendement photosynthétique. En effet, Vivancos *et al.* (2011) ont démontré que le glyphosate pouvait affecter l'abondance des protéines liées au PSII et que cela était causé par la perturbation de la synthèse des acides aminés aromatiques.

Le glyphosate est aussi un fort agent chélatant qui affecte l'absorption et l'assimilation des cations, tels que le magnésium et le calcium, par les plantes (Eker *et al*, 2006; Cakmak *et al*, 2009; Zobiolo *et al*, 2011). Calmak *et al.* (2009) ont démontré une diminution du contenu en magnésium dans les feuilles de plants de soya non résistants au glyphosate, suite à une exposition au glyphosate, de même qu'une diminution du contenu en chlorophylle. Le magnésium étant un élément essentiel impliqué dans la biosynthèse de la chlorophylle *a*, une diminution du contenu en magnésium suite à l'exposition du phytoplancton au glyphosate, pourrait affecter aussi bien le contenu en chlorophylle *a* que le rendement photosynthétique.

*Objectif 2* : Déterminer l'impact du glyphosate, aux concentrations environnementales, sur la communauté de phytoplancton d'un ruisseau en milieu agricole.

Il existe certaines limites à l'utilisation des bioessais monospécifiques effectués en laboratoire. En effet, ces tests monospécifiques sont très utiles pour observer les effets d'un polluant sur un paramètre physiologique spécifique. Par contre, il peut être difficile d'extrapoler les résultats obtenus à la réalité du milieu naturel. Par exemple, une valeur de  $CE_{50}$ , dose à laquelle on obtient 50% d'inhibition, obtenue en laboratoire pour une espèce donnée, sera différente s'il y a un changement dans ses conditions de culture, tels que la température (Bérard *et al.*, 1999). De plus, les conditions de test en laboratoire ne reflètent pas nécessairement les conditions réelles du milieu naturel dans lequel on retrouve ces organismes (Lewis, 1995). Finalement, les tests monospécifiques ne tiennent pas compte des interactions entre les différents organismes vivants au sein d'une même communauté, donc de la structure de cette communauté et c'est pourquoi les études à l'échelle de la communauté sont nécessaires et complémentaires aux bioessais monospécifiques.

*Hypothèse 2 : L'exposition d'une communauté de phytoplancton au glyphosate modifie sa structure en favorisant certaines espèces par rapport aux autres, à cause de leurs différences physiologiques.*

Dans une revue de la littérature, DeLorenzo *et al.* (2001), ont démontré que la structure et la fonction des communautés de microorganismes aquatiques pouvaient être modifiées suite à l'exposition à divers pesticides. En ce qui a trait au glyphosate, Stachowski-Haberkorn *et al.* (2008) ont étudié l'effet de l'herbicide Roundup®, à base de glyphosate, sur des communautés procaryotes et eucaryotes de milieu marin, démontrant une diminution du nombre total d'espèces. De plus, certaines espèces ont vu leur abondance augmenter suivant l'augmentation des concentrations de Roundup®, indiquant une certaine tolérance à l'herbicide. Dans l'étude de Vera *et al.* (2010), sur les effets du Roundup® sur le périphyton, les auteurs ont démontré que les cyanobactéries étaient favorisées dans les mésocosmes traitées à l'herbicide alors que les diatomées avaient un plus haut taux de mortalité. Ces résultats portent à croire que les herbicides à base de glyphosate pourraient ainsi perturber la communauté de phytoplancton dans les cours d'eau en milieu agricole, en favorisant la présence de certaines espèces aux dépens des autres.

## CHAPITRE II

### GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE REDUCES ALGAE AND CYANOBACTERIA GROWTH AND PSII CAPACITY

ÉLISE SMEDBOL<sup>1</sup>, MICHEL LABRECQUE<sup>2</sup>, LAURENT LEPAGE<sup>3</sup>, MARC LUCOTTE<sup>3</sup>,  
PHILIPPE JUNEAU<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université du Québec à Montréal, Département des Sciences biologiques -  
Environmental Toxicology Research Center (TOXEN), Succ. Centre-Ville, C.P. 8888, H3C  
3P8, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Université de Montréal, Institut de recherche en biologie végétale, 4101, rue  
Sherbrooke Est, H1X 2B2, Montréal, Québec, Canada

<sup>3</sup> Université du Québec à Montréal, Institut des Sciences de l'environnement, Succ.  
Centre-Ville, C.P. 8888, H3C 3P8, Montréal, Québec, Canada.

Correspondance: P. Juneau, Université du Québec à Montréal, Department of  
Biological Sciences - Environmental Toxicology Research Center (TOXEN), Succ. Centre-  
Ville, C.P. 8888, H3C 3P8, Montréal, Québec, Canada

E-mail: [juneau.philippe@uqam.ca](mailto:juneau.philippe@uqam.ca) Tel.: +1 514 987 3000 #3988. Fax: +1 514 987 4647

Cet article sera soumis dans la revue scientifique *Ecotoxicology and environmental safety*.

## 2.1 Contributions

Élise Smedbol a réalisé le plan d'expérience, les bioessais en laboratoire, l'analyse des résultats et la rédaction, alors que Marc Lucotte et Philippe Juneau ont participé à l'élaboration du plan d'expérience, effectué la supervision des travaux de laboratoire et participé à la rédaction du texte, alors que Michel Labrecque et Laurent Lepage ont révisé le texte.

## 2.2 Abstract

The use of glyphosate-based herbicides in agriculture have undergone a great expansion in the last few years and there is now some evidence of glyphosate's leaching and contamination of aquatic ecosystems. Algae bioassays using chlorophyll *a* fluorescence measurements are useful, effective and low cost tools for the determination of pesticide effects on aquatic plants. The aim of this study was to verify the effects of a glyphosate-based herbicide (Factor 540®) on growth and photosynthetic capacity of algae and cyanobacterias. Six algal and three cyanobacteria species, isolated from Choinière reservoir (Eastern townships, Quebec, Canada) or laboratory strains, from three different taxonomic groups were exposed to six glyphosate concentrations (10, 50, 100, 300, 500 and 1000 µg l<sup>-1</sup>) for a 48 hours period. Most species, except *Ankistrodesmus falcatus*, had their growth rates (µ) significantly reduced at concentrations varying between 50 and 1000 µg l<sup>-1</sup>. The photosynthetic response after glyphosate exposure varied for the different species but a general pattern has emerged. There was an increase of the amount of absorbed photons (ABS/RC), of dissipated (DI<sub>O</sub>/RC) and trapped (TR<sub>O</sub>/RC) energy in photosystem II reaction centers, with a decrease of the maximal photosystem II yield (F<sub>V</sub>/F<sub>M</sub>) and electron transport (ET<sub>O</sub>/RC). EC<sub>10</sub> values were calculated for growth and photosynthesis showing that growth rate was the most sensitive parameter following glyphosate exposure, while F<sub>V</sub>/F<sub>M</sub> was the least sensitive. Some species (*Microcystis* sp., *Scenedesmus obliquus* and *Oocystis solitaria*) showed a reduced growth and photosynthetic capacity at glyphosate concentrations lower than the Canadian standard for the protection of aquatic life of 65 µg l<sup>-1</sup>, raising concerns about the efficiency of risk assessment linked to glyphosate-based herbicides.

**Keywords:** herbicide, chlorophyll fluorescence, rapid fluorescence rise, PSII, PEA

## 2.3 Résumé

L'utilisation des herbicides à base de glyphosate en agriculture a connu une grande expansion depuis les dernières années et il y a maintenant des évidences du lessivage du glyphosate vers le milieu aquatique et de la contamination de ces écosystèmes. Les bioessais algaux avec mesures de la fluorescence chlorophyllienne sont des outils pratiques, efficaces et peu coûteux pour la détermination des effets toxiques des pesticides sur les plantes aquatiques. Le but de cette étude était de vérifier les effets d'un herbicide à base de glyphosate (Factor 540®) sur la croissance et la capacité photosynthétique des algues et des cyanobactéries. Six espèces d'algues et trois espèces de cyanobactéries, isolées à partir d'échantillons prélevés dans le Réservoir Choinière (Cantons-de-l'Est, Quebec, Canada) et des souches de laboratoire, de



trois groupes taxonomiques distincts furent exposés à six concentrations de glyphosate (10, 50, 100, 300, 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) pendant une période de 48 heures. Le taux de croissance ( $\mu$ ) fut mesuré, démontrant une diminution de la croissance des algues et cyanobactéries, sauf pour l'espèce *Ankistrodesmus falcatus*, à des concentrations variant entre 50 et 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ . La réponse photosynthétique, après exposition au glyphosate, fut variable pour les différentes espèces. Il fut possible de déterminer un schéma global où la quantité de photons absorbée ( $\text{ABS/RC}$ ), la quantité d'énergie dissipée ( $\text{DI}_0/\text{RC}$ ) et captée ( $\text{TR}_0/\text{RC}$ ) par centre réactionnel du photosystème II augmentent, alors que le rendement maximal du photosystème II ( $F_v/F_M$ ) et le transport d'électron ( $\text{ET}_0/\text{RC}$ ) diminuent. Les valeurs de  $\text{CE}_{10}$  furent calculées pour le taux de croissance et la capacité photosynthétique démontrant que le taux de croissance fut l'indicateur le plus sensible, alors que le paramètre  $F_v/F_M$  fut le moins sensible. De plus, certaines espèces ont vu leur croissance et leur capacité photosynthétique réduite à des concentrations se situant sous la norme canadienne de la protection de la vie aquatique de 65  $\mu\text{g l}^{-1}$ , soulevant des inquiétudes en lien avec la pertinence de l'évaluation des risques liés aux herbicides à base de glyphosate.

**Mots-clés:** herbicide, fluorescence chlorophyllienne, cinétique rapide de fluorescence, PSII, PEA

## 2.4 Introduction

Glyphosate-based herbicides are the most widely used herbicides in the world, generally employed with transgenic soy and maize crops (Duke and Powles, 2008). Aside from their efficiency, the increased adoption rate of these herbicides for agricultural use is partly related to the perception of their low environmental impacts. Indeed, until recently, they were reported to have low toxicity on non-target organisms, a short half-life and low mobility in soils (Borggaard et Gimsing, 2008; Duke and Powles, 2008; Helander *et al.*, 2012). Vereecken (2005) suggest that, despite strong soil sorption properties, in reference to high soil organic carbon/water partitioning coefficient ( $K_{oc}$ ) values, glyphosate leaching towards aquatic systems occurs following specific mechanisms such as preferential water flow and episodes of high rainfall intensity. Indeed, monitoring studies from Quebec (Canada) showed the presence of glyphosate in watercourses near intensive cultures of soy and maize, with maximal concentrations varying from 2.7 to 29  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Giroux and Pelletier, 2012). Similar surveys in Ontario (Canada) (Struger *et al.*, 2008), United States (Scribner *et al.*, 2007) and France (Dubois *et al.*, 2010), also revealed the presence of glyphosate in watercourses, with maximal concentrations varying from 0.1 to 427  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Projections indicate that the frequency of detection of glyphosate in aquatic ecosystems will increase worldwide in the next few years, due to the increasing usage of glyphosate resistant (GR) transgenic crops, especially soy and maize (Giroux and Pelletier, 2012).

Glyphosate N-(phosphonomethyl)glycine is a systemic and non-selective herbicide, commercialized in 1974, by Monsanto (Duke et Powles, 2008). It inhibits the shikimate pathway in plants, by competing with the enzyme 5-enolpyruvoylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS) (EC. 2.5.1.19), leading to the accumulation of the substrate shikimate 3-phosphate in plants chloroplasts and to the inhibition of the biosynthesis of chorismate and its by-products (Dewick, 1998; Fedtke et Duke, 2005; Duke et Powles, 2008). Despite these effects, glyphosate also interferes with photosynthesis (Zobiolo *et al.*, 2010, 2012), by forming complexes with cations which are co-factors of important photosynthetic components: magnesium as a co-factor in chlorophyll synthesis (Zobiolo *et al.*, 2011), manganese and calcium as co-factors of the Mn-cluster (Umena *et al.*, 2011) and iron as an essential component of the ferredoxin protein (Raven *et al.*, 2005). Mateos-Naranjo *et al.* (2009) showed a decrease of the maximum photosystem II (PSII) quantum yield ( $F_v/F_m$ ), the operational PSII quantum yield ( $\Phi_{PSII}$ ), the net photosynthetic rate, the stomatal conductance, the intracellular  $CO_2$  concentrations and the photosynthetic pigments concentrations, in the macrophyte *Spartina densiflora*. Similar results were found in other superior plants, such as GR soybeans (Zobiolo *et al.*, 2012), glyphosate sensitive soybeans (Vivancos *et al.*, 2011), glyphosate sensitive *Lolium perenne* (Yanniccari *et al.*, 2012) and cogongrass (*Imperata cylindrical* L.) (Huang *et al.*, 2012). Concerning non-target aquatic plant species, Choi *et al.* (2012) found a decrease of  $F_v/F_m$  for five microalgal species when exposed to glyphosate, with some interspecific differences in terms of glyphosate sensitivity.

The aim of the present study was to evaluate the effect of a glyphosate-based herbicide on several algal and cyanobacteria species, isolated from the Choinière reservoir (Eastern Townships, Quebec, Canada) or from pure culture, from three taxonomic classes by evaluating the PSII energy fluxes. The maximum quantum efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ) and the different PSII energy fluxes ( $ABS/RC$ ,  $TR_o/RC$ ,  $DI_o/RC$  and  $ET_o/RC$ ) were evaluated.

## 2.5 Material and Methods

### 2.5.1 Algal cultures and testing procedure

Bioassays were performed with algal and cyanobacteria species, from three different taxonomic groups, with strains coming from the Canadian Physiological Culture Center

(CPCC), as well as species isolated from environmental water samples collected in Choinière reservoir, Eastern townships, Quebec, Canada (Deblois *et al.*, 2013) (see table I). All species were cultivated in 250 ml Erlenmeyers, containing 100 ml of growth medium. The growth medium Bold Basal Medium (BBM) pH 6.8 was prepared following Stein (1973) and Modified High Salt Medium (HSM) pH 6.8 was prepared following Sueoka *et al.* (1967). All species were acclimated in growth chamber at 20°C, with a 12 hours dark-light photoperiod and day-time light intensity of 100  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , for a period of four weeks before the beginning of the experiment. All assays were performed using the organisms in exponential growth phase. The glyphosate-based herbicide tested in this study was the commercial formulation Factor540® (540 g l<sup>-1</sup> of pure glyphosate) (IPCO, Winnipeg, Manitoba, Canada). Algae and cyanobacteria were exposed to Factor540® at six glyphosate concentrations: 10, 50, 100, 300, 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ , for 48 hours. All pesticide dilutions were made in sterile growth medium, BBM or modified HSM, depending on the species.

**Tableau 2.1 Species used for bioassays, testing growth and photosynthetic capacity of algae and cyanobacteria exposed to glyphosate-based herbicide**

Groupe	Species	Growth medium
Cyanobacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i> , (CPCC632)	BBM
	<i>Microcystis aeruginosa</i> , (CPCC299)	
	<i>Microcystis</i> sp.*	
Chlorophytes	<i>Scenedesmus obliquus</i> (CPCC5)	HSM
	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> *	
	<i>Oocystis solitaria</i> *	
	<i>Chlamydomonas snowii</i> *	
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , (CPCC125)	
Cryptophyte	<i>Cryptomonas obovata</i> *	BBM

\*Species isolated from Choinière reservoir, Eastern townships, Quebec, Canada (Deblois *et al.*, 2013)

## 2.5.2 Growth evaluation

Population growth rate ( $\mu$ ) measures were based on cell count performed with Multisizer™ 3 COULTER COUNTER® (Beckman Coulter, Inc.) and calculated as:

$$\mu = [\ln(\text{number of cells}(t_2)) - \ln(\text{number of cells}(t_1))] / (t_2 - t_1) \quad (2.1)$$



were  $t_1$  = time before glyphosate-based herbicide exposure

and  $t_2$  = 48 hours after exposure

Then reported to % of growth compared to control treatment, i.e. without herbicide exposure:

$$[(\mu \text{ control} - \mu \text{ sample}) / (\mu \text{ control})] \times 100 \quad (2.2)$$

### 2.5.3 Photosynthetic capacity measurements

Photosynthetic capacity was estimated using the Plant Efficiency Analyser (Handy PEA, Hansatech Instruments LTD, England), which measures chlorophyll *a* fluorescence of photosystem II (PSII) in dark-adapted plant cells, following the O-J-I-P transients (Strasser, 1995). The first phase (O-J) represents the reduction of plastoquinone molecules ( $Q_A$  to  $Q_A^-$ ), occurring after the acceptance of electrons from pheophytin (Dwivedi and Bhardwaj, 1995) under constant illumination. The P level is reached when all the plastoquinone molecules are reduced and I level is an intermediate level (Strasser, 1995).

After 48 hrs exposure to glyphosate, all samples were dark-adapted for a period of 15 minutes, prior to chlorophyll *a* fluorescence measurement with PEA. Then, each sample was homogenized and transferred to a 2 ml cuvette, for liquid-phase measurements, which consists in a 6 second illumination ( $3500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). The initial level of chlorophyll *a* fluorescence ( $F_O$ ) is the fluorescence level at  $50\mu\text{s}$  ( $F_O = F_{50\mu\text{s}}$ ) when all plastoquinone molecules are open, i.e. in a non-reduced state. The maximal level ( $F_M$ ) corresponds to the higher fluorescence value of the total kinetic and occur when all transporters are reduced or closed (Maxwell and Johnson, 2000). These two values represent two different energy states occurring in PSII. The following formula was used to calculate the photosynthetic yield:

$$(F_M - F_{50\mu\text{s}}) / F_M \quad (2.3)$$

Photosynthetic parameters calculated from the O-J-I-P transients were measured following the energy fluxes model developed by Force *et al.* (2003) (table II), where O corresponds to  $F_{50\mu\text{s}}$ , J to  $F_{2\text{ms}}$ , I to  $F_{30\text{ms}}$  and P to  $F_M$ . The PSII energy flux model is a simplified model of the

energy fluxes in the reaction centers of the photosystem II (PSII), from light absorption to electron transport, based on the model proposed by Strasser *et al.* (1995). At first, photons are absorbed by chlorophyll molecules in the antennas and become excited (Chl\*) (ABS). A certain amount is dissipated by heat or fluorescence (DI), while the other part is trapped (TR) by the reaction centers, reducing plastoquinones A ( $Q_A$ ) to  $Q_A^-$  and transported towards the electron transport chain (ET), through the reoxydation of  $Q_A^-$ . These specific parameters can be expressed as a ratio by reaction centers (RC), which is referred to the «specific energy fluxes» by Strasser *et al.* (2000) (table 2.2).

**Tableau 2.2**      **Photosynthetic parameters as described by Force *et al.* (2003), energy fluxes model, based on Strasser *et al.* (1995), measured using the Plant Efficiency Analyser**

Parameter	Formula
ABS/RC	$[(TR_0/RC) / (TR_0/ABS)]$
$TR_0/RC$	$(M_0 / VJ)$
$ET_0/RC$	$[(TR_0/RC) \cdot (ET_0/TR_0)]$
$DI_0/RC$	$[(ABS/RC) - (TR_0/RC)]$
$V_J$	$[(F_{2ms} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})]$
$M_O$	$[4 \times (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})]$

The parameters  $V_J$  and  $M_O$  are used to calculate the  $TR_0/RC$  parameter and correspond, respectively to the number of closed reaction centers at 2ms and to the net rate of PSII closure (Force *et al.*, 2003).

#### 2.5.4 Statistical analysis

To compare the growth rates and photosynthetic parameters for each glyphosate concentration (10, 50, 100, 300, 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) and for each species, mean paired comparisons were conducted using the non parametric Wilcoxon test, since the data did not fulfill the test conditions for normality. The lowest observed adverse effect level (LOAEL)

was determined as the lowest significant concentration inducing a physiological alteration, when comparing to control, using the Wilcoxon test. The half maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ) or the concentration inducing a 50% physiological alteration compared to control was calculated from dose response curves, using log-log simple regressions, according to the equations of the relation between glyphosate concentrations and the measured parameters: growth rate,  $F_v/F_m$ ,  $ABS/RC$ ,  $DI_O/RC$ ,  $TR_O/RC$  and  $ET_O/RC$  (see table 2.2). The dependant variable (y) was reported on % compared to control. All statistical analyzes were made using JMP 10 software from SAS.

## 2.6 Results

### 2.6.1 Growth

Table 2.3 presents growth rates of the six algal and three cyanobacteria species exposed to different glyphosate concentrations. The green algae *Ankistrodesmus falcatus* was the least glyphosate-sensitive species, since the growth rate at the highest glyphosate concentration was not different from the control. *Chlamydomonas snowii* and *Cryptomonas obovata* were sensitive only at the highest concentration ( $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ). *Chlamydomonas reinhardtii* (CPCC125) and *Microcystis aeruginosa* (CPCC632) had a growth rate differing from the control treatment when exposed to a glyphosate concentration of  $300 \mu\text{g l}^{-1}$ . For the toxic cyanobacteria strain, *Microcystis aeruginosa* (CPCC299), the growth rate at a concentration of  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  was significantly lower than the control treatment. *Oocystis solitaria* showed the same sensitivity at  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ . The two most sensitive species were the green algae *Scenedesmus obliquus* (CPCC5) and the cyanobacteria *Microcystis* sp., showing sensitivity at a glyphosate concentration of  $50 \mu\text{g l}^{-1}$ .

**Tableau 2.3 Mean growth rates ( $\mu$ ) and standard deviations for each algae and cyanobacteria species at different glyphosate concentrations**

Species	[glyphosate] $\mu\text{g L}^{-1}$						
	Control	10	50	100	300	500	1000
<i>Microcystis aeruginosa</i> (CPCC632)	0.47 $\pm 0.06$	0.46 $\pm 0.06$	0.44 $\pm 0.07$	0.35 $\pm 0.14^*$	0.12 $\pm 0.24^*$	0 $\pm 0.02^*$	0 $\pm 0.04^*$
<i>Microcystis aeruginosa</i> (CPCC299)	0.44 $\pm 0.09$	0.40 $\pm 0.09$	0.32 $\pm 0.12$	0.24 $\pm 0.2^*$	NA	0.03 $\pm 0.06^*$	0 $\pm 0.09^*$
<i>Microcystis</i> sp.	0.50 $\pm 0.04$	0.47 $\pm 0.03$	0.42 $\pm 0.05$	0.26 $\pm 0.05^*$	0 $\pm 0.04^*$	0 $\pm 0.04^*$	0 $\pm 0.13^*$
<i>Scenedesmus obliquus</i> (CPCC5)	0.52 $\pm 0.05$	0.35 $\pm 0.30$	0.26 $\pm 0.11^*$	0.20 $\pm 0.16^*$	0.29 $\pm 0.10^*$	0 $\pm 0.11^*$	0 $\pm 0.19^*$
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	0.75 $\pm 0.03$	0.71 $\pm 0.03$	0.66 $\pm 0.02$	0.64 $\pm 0.01$	0.59 $\pm 0.04$	NA	0.30 $\pm 0.12$
<i>Oocystis solitaria</i>	0.46 $\pm 0.01$	0.43 $\pm 0.03$	0.40 $\pm 0.05$	0.21 $\pm 0.03^*$	NA	0.08 $\pm 0.02^*$	0 $\pm 0.03^*$
<i>Chlamydomonas snowii</i>	0.47 $\pm 0.04$	0.41 $\pm 0.07$	0.40 $\pm 0.07$	0.42 $\pm 0.13$	0.42 $\pm 0.05$	0.51 $\pm 0.02$	0 $\pm 0.38^*$
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CPCC125)	0.67 $\pm 0.24$	0.61 $\pm 0.25$	0.55 $\pm 0.22$	0.61 $\pm 0.18$	0.45 $\pm 0.06^*$	0.19 $\pm 0.21^*$	0.10 $\pm 0.10^*$
<i>Cryptomonas obovata</i>	0.21 $\pm 0.05$	0.23 $\pm 0.07$	0.23 $\pm 0.08$	0.23 $\pm 0.04$	0.17 $\pm 0.02$	0.17 $\pm 0.08$	0.007 $\pm 0.02^*$

\* Indicates treatments that are significantly different from the control treatment without glyphosate exposure ( $\alpha = 0.05$ ).

### 2.6.2 Photosynthesis

In general, for all nine species, after glyphosate exposure,  $ABS/RC$ ,  $TR_O/RC$  and  $DI_O/RC$  parameters tend to increase, while  $ET_O/RC$  and the  $F_V/F_M$  ratio tend to decrease (Figure 2.1). However, there was some specificity for each species. For the green algae *Ankistrodesmus falcatus* the  $F_V/F_M$  ratio was higher at the highest glyphosate dose (Figure 2.1A). This is the only species showing an increase of  $F_V/F_M$  after glyphosate exposure. All other species had a  $F_V/F_M$  ratio significantly lower at the highest glyphosate concentration. Indeed, for *Chlamydomonas reinhardtii* (CPCC125), *Microcystis* sp., *Scenedesmus obliquus* (CPCC5), *Microcystis aeruginosa* (CPCC632) and *Oocystis solitaria*, the  $F_V/F_M$  ratio was lower at a glyphosate concentration of  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  compared to lower concentrations. The  $ABS/RC$  parameter was increased for the majority of species at the glyphosate concentration of  $500 \mu\text{g l}^{-1}$ , except for *Ankistrodesmus falcatus* and *Cryptomonas obovata* (Figure 2.1B). A similar increase was observed for the  $DI_O/RC$  parameter (Figure 2.1C). Regarding  $TR_O/RC$ , only a few species showed an increase at high glyphosate concentrations ( $500$  and  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ): *Scenedesmus obliquus* (CPCC5), *Chlamydomonas reinhardtii* (UTCC125), *Oocystis solitaria* and *Chlamydomonas snowii*, while the other species showed no difference from the control treatment (Figure 2.1D). For  $ET_O/RC$ , the majority of the species showed a decrease at the highest glyphosate concentration, except for *Ankistrodesmus falcatus* and *Cryptomonas obovata* (Figure 2.1E). There was a decrease of this parameter for the non-toxic cyanobacteria strain *Microcystis aeruginosa* (CPCC632), at a glyphosate concentration of  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ .

The effective concentration inducing 10% of effect compared to the control treatment ( $EC_{10}$ ), shown in table 2.4, express the interspecific sensitivity of the different algal and cyanobacteria species, regarding growth and PSII energy fluxes. The growth rate was the most sensitive parameter being affected by glyphosate exposure, except for *Ankistrodesmus falcatus*. For this species,  $F_V/F_M$ ,  $ABS/RC$  and  $TR_O/RC$  were more sensitive than the growth rate, while  $DI_O/RC$  and  $ET_O/RC$  showed no sensitivity towards glyphosate. *Cryptomonas obovata*, the second least sensitive species, showed no sensitivity of the photosynthetic parameters  $F_V/F_M$ ,  $TR_O/RC$  and  $ET_O/RC$ . The other studied species were very sensitive to glyphosate regarding growth rate ( $EC_{10} < 10 \mu\text{g l}^{-1}$ ), but their sensitivity toward the different



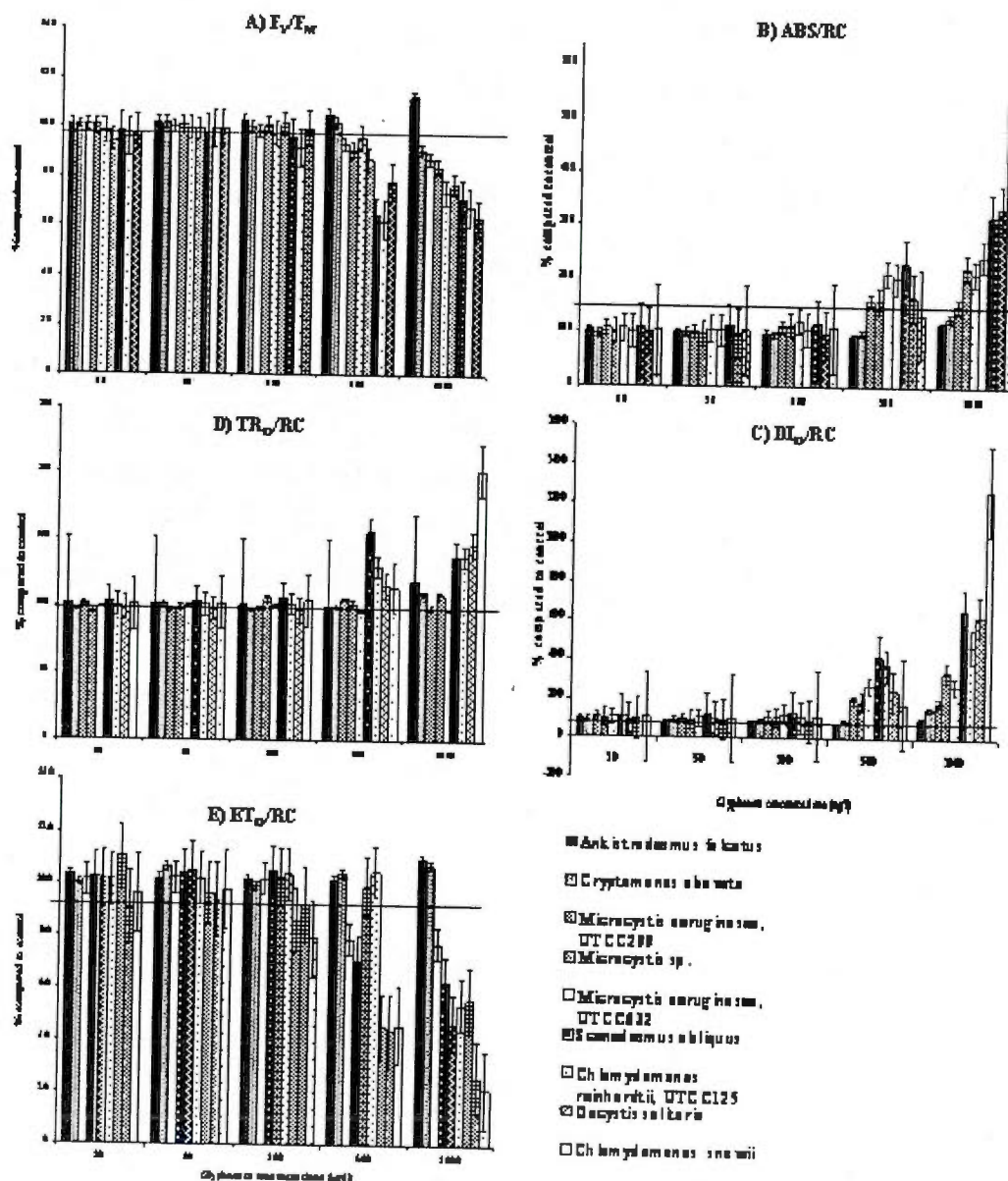


Figure 2.1 Energy fluxes in PSII of six algal and three cyanobacteria species exposed to increasing glyphosate concentrations for a 48 hours period, based on the model developed by Force *et al.*, (2003). A) Maximal PSII quantum yield ( $F_v/F_m$ ). B) Effective antenna size of an active reaction center ( $ABS/RC$ ). C) Effective dissipation of an active reaction center ( $DI_o/RC$ ). D) Maximal trapping rate of PSII ( $TR_o/RC$ ). E) Electron transport in an active reaction center ( $ET_o/RC$ ). The horizontal line represents the control treatment (100%).

photosynthetic parameters varied, as shown by the range of  $EC_{10}$  values. The three cyanobacteria showed no sensitivity of the  $TR_O/RC$  parameter, while chlorophytes were sensitive to this parameter, with  $EC_{10}$  varying from 164 to 598  $\mu\text{g l}^{-1}$ . For the other parameters, the  $EC_{10}$  values for the different species varied between 192-788  $\mu\text{g l}^{-1}$  ( $F_V/F_M$ ), 11-717  $\mu\text{g l}^{-1}$  ( $ABS/RC$ ), <10-356  $\mu\text{g l}^{-1}$  ( $DI_O/RC$ ) and 74-451  $\mu\text{g l}^{-1}$  ( $ET_O/RC$ ) (see table 2.4). In general, and for all growth and photosynthetic parameters, the most sensitive specie was *Microcystis aeruginosa* (CPCC632) and the least sensitive was *Ankistrodesmus falcatus*.

**Tableau 2.4**  $EC_{10}$  values ( $\mu\text{g l}^{-1}$  of glyphosate) for each parameter (growth and photosynthesis) and each species exposed to increasing glyphosate concentrations for a 48 hours period

Species	Parameters					
	Growth	$F_V/F_M$	$ABS/RC$	$DI_O/RC$	$TR_O/RC$	$ET_O/RC$
<i>Microcystis aeruginosa</i> (CPCC632)	<10	192	11	<10	>1000	78
<i>Microcystis aeruginosa</i> (CPCC299)	<10	704	152	63	>1000	176
<i>Microcystis</i> sp.	<10	406	94	76	>1000	74
<i>Scenedesmus obliquus</i> (CPCC5)	<10	280	37	35	186	328
<i>Oocystis solitaria</i>	<10	272	109	81	294	325
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (CPCC125)	70	788	83	46	256	451
<i>Chlamydomonas snowii</i>	91	476	99	84	164	370
<i>Cryptomonas obovata</i>	214	>1000	547	356	>1000	>1000
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	860	745	717	>1000	598	>1000

## 2.7 Discussion

Strasser *et al.* (2000) explains the increase of the amount of photons absorbed by reaction centers ( $ABS/RC$ ) by an increased amount of inactivated reaction centers ( $RC$ ). Indeed, the

apparent amount of absorbed light energy seems higher, per reaction center, and this is caused by an increased amount of inactive RC's. This is also followed by an increase of the dissipation energy ( $DI_O/RC$ ), which is also higher because there is less active RC's. This phenomenon occurred in algae and cyanobacteria cells after glyphosate-based herbicide exposure, as shown in figure 2.1, where the parameters  $ABS/RC$  and  $DI_O/RC$  increased, meaning that glyphosate induced the inactivation of reaction centers of PSII. This can also be reflected by the increased amount of energy trapped by PSII, ( $TR_O/RC$ ), since there are less activated reaction centers. Indeed, the amount of trapped energy seems higher per RC, but this is caused by less activated RC's (Strasser *et al*, 2000, Force *et al*, 2003). However, the increase of the trapped energy ( $TR_O/RC$ ) only occurred in green algae (*S. obliquus*, *O. solitaria*, *C. reinhardtii*, *C. snowii* and *A. falcatus*) at high glyphosate concentrations (500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). The three species of cyanobacteria, as well as the cryptophyte, *C. obovata*, showed no variation in the amount of trapped energy ( $TR_O/RC$ ), when compared to the control. However, the electron transport ( $ET_O/RC$ ) and the amount of energy absorbed by the antenna complex ( $ABS/RC$ ) were reduced, while the amount of dissipated energy ( $DI_O/RC$ ) was increased, for cyanobacteria. The electron transport rate ( $ET_O/RC$ ) and maximal PSII quantum yield ( $F_V/F_M$ ) of *C. obovata* were not affected by glyphosate-based herbicide. For the other species, the inactivation of reaction centers or the incapacity of reducing  $Q_A$  to  $Q_A^-$ , was reflected by a decrease of the electron transport ( $ET_O/RC$ ), since the reoxydation of  $Q_A^-$  did not occur, impacting the electron transport beyond  $Q_A$  (Strasser *et al*, 2000, Force *et al*, 2003). This is supported by the decrease of the maximal  $F_V/F_M$ , indicating a decreased ability of algae and cyanobacteria to use light energy to perform photochemical reactions.

The three most sensitive species where the three cyanobacteria species (*M. aeruginosa* [CPCC299, CPCC632] and *Microcystis sp.*), regarding growth and most of the photosynthetic parameters, except for  $TR_O/RC$ . These results clearly indicate a higher sensitivity of cyanobacteria to Factor540<sup>®</sup> herbicide compared to the other species studied. Also, it indicates that there are some metabolic differences regarding the effects on PSII capacity between cyanobacteria and green algae when exposed to this glyphosate-based herbicide. The observed differences on energy fluxes of cyanobacteria and the other algae studied may be explained through the differences of PSII structure. The PSII structure in cyanobacteria is slightly different from PSII structure in green algae and superior plants,



mostly through the organization of the antenna complex. Indeed, the antenna complex in cyanobacteria is located in the cytoplasm and is composed mainly of phycobilisomes as the light absorbing pigment (Govindjee *et al.*, 2010). As proposed by Perron et Juneau (2011), cyanobacteria could be more sensitive to pollutants through their prokaryotic nature, since their photosynthetic apparatus is less complex and their antioxidant response, less efficient. Algae from the *Cryptophyceae* family also have phycobilins as part of their antenna complex (Gantt *et al.*, 1971), while green algae possess mainly chlorophyll *a* and *b*, and carotenoids (Jeffrey *et al.*, 2011). It is known that the phycobilisomes are very mobile, moving between PSII and PSI, allowing the distribution of the light energy through their reaction centers (Joshua and Mullineaux, 2004). This process, known as state-transition, might modulate the effects of glyphosate-based herbicides on the PSII reaction centers, especially on the amount of energy trapped by PSII ( $TR_0/RC$ ), since the energy can be distributed to PSI if an excess occurs at the PSII level. State-transition mechanism will help maintaining a higher photosynthetic yield when cryptophytes or cyanobacteria are subjected to environmental stress. Indeed, the absorption of light energy by PSII ( $ABS/RC$ ) will decrease since there is less antennas associated to this photosystem (Finazzi and Forti, 2004), thus reducing possible damages to the photosynthetic apparatus. This might explain why the maximal PSII quantum yield ( $F_v/F_m$ ) was the least sensitive photosynthetic parameter, following a glyphosate-based herbicide exposure, in our study. These results indicate that the type of pigments found in the light harvesting complex seems to impact the glyphosate-based herbicide toxicity in algae and cyanobacterias.

The growth and photosynthetic capacity of the green alga *Ankistrodesmus falcatus* did not fit the pattern of any other species, and were the least affected by the glyphosate-based herbicide used in this study. At the highest glyphosate concentration, this specie even showed a small increase of the PSII photosynthetic efficiency ( $F_v/F_m$  and  $ET_0/RC$ ). This is in accordance with Cedergreen and Olsen (2010) who proposed that plants could increase their photosynthetic ability at low glyphosate concentrations by increasing their carbon fixation capacities. Wong (2000) also found a growth stimulation for the green alga *Scenedesmus quadricauda*, at glyphosate concentration of  $20 \mu g\ l^{-1}$ . However, in our study there was no growth stimulation, which is in accordance with other studies on the effects of glyphosate-based herbicides on algae and cyanobacteria growth (Christy *et al.*, 1981; Vendrell *et al.*,

2009; Kaushik, 2010; Lipok *et al.*, 2010). Cerdergreen and Olsen (2010) used the isopropylamine salt (IPA) formulation of glyphosate, while Wong (2000) used the [N-(phosphonomethyl) glycine] active ingredient. It was demonstrated that glyphosate-based herbicides containing surfactants, such as polyethoxylated tallow amine (POEA) which facilitates the penetration of the herbicide inside the organisms, had acute toxicity towards water photoautotrophs when compared to IPA and [N-(phosphonomethyl) glycine] acid (Lipok *et al.*, 2010). We did not observe any growth stimulation at low glyphosate concentrations found in the commercial formulation Factor540<sup>®</sup>, containing 49% of glyphosate and 51% of unknown ingredients, which might includes surfactants (IPCO, Winnipeg, Manitoba, Canada). It is also possible that glyphosate degradation into aminomethylphosphonic acid (AMPA) occurred, even if the experiment was done in sterile conditions, via algae and cyanobacteria themselves. Indeed, it have been hypothesized by Franz *et al.* (1997) that plants might be able to degrade a fraction of glyphosate into AMPA, in a similar way than microorganisms degrade glyphosate into AMPA in soils and water. If so, AMPA might had exerted some phytotoxicity, preventing growth stimulation in our conditions.

The inhibitory effects of the glyphosate-based herbicide on the reduction of  $Q_A$  in PSII might occur via its inhibitory effects on the shikimate pathway leading to a perturbation of the biosynthesis of aromatic amino acids, especially tyrosine. Firstly, after water photolysis, the manganese cluster reduces a tyrosine residue that is part of the D1 protein: Tyr 161 also named  $Y_Z$ . The function of the tyrosine residue is to re-reduce the P680 chlorophyll, by transferring electrons from the Mn-cluster. P680\* then reduces a pheophytin molecule, itself reducing  $Q_A$  (Dau, 1994; Strasser *et al.*, 1995; Govindjee *et al.*, 2010). A reduction of the biosynthesis of tyrosine caused by glyphosate inhibition of the shikimate pathway could lead to a decrease of the number of  $Q_A^-$  and reduced PSII capacity, when compared to algae and cyanobacteria not exposed to glyphosate-based herbicides. There is also evidence that glyphosate might interfere with manganese ( $Mn^{2+}$ ) bioavailability through its chelating effects, in water (Bernards *et al.*, 2005) and in plant leaves and seeds (Eker *et al.*, 2006; Cakmak *et al.*, 2009). Manganese is an essential co-factor of the oxygen-evolving complex, which reduces Tyr 161 (Kern et Renger, 2007; Umena *et al.*, 2011) and a lack of manganese availability might affect the amount of energy trapped by PSII ( $TR_O/RC$ ). It seems that, in

both cases state-transition will occur. Indeed, Wollman and Lemaire (1988), verified state-transition in *Chlamydomonas reinhardtii* mutants lacking the proteins D1 and D2 in PSII. In another study, Finazzi and Forti (2004), verified that state-transition was induced by nutrient deficiency, also in *Chlamydomonas reinhardtii*. Finally, there is several scientific evidences on glyphosate effects on the chlorophyll content in plants (Kitchen *et al*, 1981; Muñoz-Rueda *et al*, 1986; Zobiolo *et al*, 2011) and green algae (Wong, 2000). However, it is not well known how exactly glyphosate might interfere with chlorophyll content, either by a perturbation of chlorophyll synthesis or by the formation of reactive oxygen species degrading the photosynthetic pigments. It was also suggested that aminomethylphosphonic acid (AMPA), glyphosate's main metabolite could play a role in the toxicity of glyphosate toward chlorophyll synthesis (Reddy *et al.*, 2004).

## 2.8 Conclusion

Increasing the use and application of glyphosate-based herbicides in agricultural fields increases the possibility of runoff and contamination of adjacent aquatic ecosystems. Risk assessments tools are necessary to monitor and prevent the effects of these herbicides on aquatic life and water quality. Concerning the phytotoxicity of the glyphosate-based herbicide Factor540<sup>®</sup>, we have demonstrated that the growth rate was a very sensitive parameter, showing sensitivity at concentrations below 10  $\mu\text{g l}^{-1}$  (EC<sub>10</sub>), which are in the range of environmental concentrations in Canada and United States. The photosystem II energy flux parameters were also sensitive to glyphosate exposure, but the sensitivity varied among species and parameters. This result implies that glyphosate-based herbicides might interfere, not only via the shikimate pathway, but also with the photosynthetic apparatus. The parameter  $F_v/F_m$ , which is often use in photosynthetic studies, was the least sensitive parameter to assess glyphosate-based herbicide effects on algae and cyanobacteria. *Microcystis* sp. and *Scenedesmus obliquus* had their growth significantly reduced at a glyphosate concentration of 50  $\mu\text{g l}^{-1}$ , which is inferior to the Canadian standard for the protection of aquatic life (65  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) (CCME, 2008) and the following species had EC<sub>10</sub> values inferior to the Canadian standard: *Microcystis aeruginosea* (UTCC632 and UTCC299), *Scenedesmus obliquus* and *Chlamydomonas reinhardtii* (UTCC125), for growth and photosynthesis.

## 2.9 Acknowledgments

This research was made possible by the financial support of the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC), awarded to the Prof. M. Lucotte, P. Juneau, M. Labrecque and L. Lepage, through the strategic project grant SABRE (*Salix en Agriculture pour des Bandes Riveraines Énergétiques*). The authors would also like to thank the members of the Prof. P. Juneau lab, for their advices and help through the experiment.



## 2.10 References

- Bellaloui, N., Reddy, K.N., Zablotowicz, R.M., Abbas, H.K., et Abel, C.A. (2009). Effects of glyphosate application on seed iron and root ferric (III) reductase in soybean cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 9569-9574.
- Bernards, M.L., Thelen, K.D., Penner, D., Muthukumaran, R.B., et McCracken, J.L. (2005). Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation. *Weed Science*, 53, 787-794.
- Borggaard, O.K., and Gimsing, A.L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64, 441-456.
- Cakmak, I., Yazici, A., Tutus, Y., et Ozturk, L. (2009). Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *European Journal of agronomy*, 31, 114-119.
- Cedergreen, N. and Olsen, C.F. (2010). Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide biochemistry and physiology*, 96, 140-148.
- Choi, C.J., Berges, J.A., et Young, E.B. (2012). Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable response among freshwater microalgae. *Water research*, 46, 2615-2626.
- Christy, S.L., Karlander, E.P., et Parochetti, J.V. (1981). Effects of glyphosate on the growth rate of *Chlorella*. *Weed Science*, 29(1), 5-7.
- Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement. (2008). *Recommandations pour la qualité des eaux au Canada*. Ottawa, Ontario.
- Dau, H. (1994). Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochemistry and photobiology*, 60(1), 1-23.
- Deblois, C.P., Dufresne, K., et Juneau, P. (2013). Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine. *Aquatic toxicology*, 126, 77-84.
- Dewick, P.M. (1998). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural product reports*, 11, 173-203.
- Dubois, A., Lacouture, L., et Feuillet, C. (2010). *Les pesticides dans les milieux aquatiques, données 2007*. Commissariat général au développement durable, Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la mer. France. Récupéré dans <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Les-pesticides-dans-les-milieux.html>



- Duke, S.O., and Powles, S.B. (2008). Glyphosate : a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319-325.
- Dwivedi, U., and Bhardwaj, R. (1995). D1 protein of photosystem II: The light sensor in chloroplasts. *Journal of Biosciences*, 20(1), 35-47.
- Eker, S., Ozturk, L., Yazici, A., Erenoglu, B., Romheld, V., et Cakmak, I. (2006). Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 10019-10025.
- Fedtko, C., and Duke, O.S. (2005). Chapitre 7, *Herbicides dans: Plant toxicology* (4e Édition). Édité par Bertold Hock; Erich F. Elstner. Taylor & Francis e-library, page 295. ISBN: 978-0-203-02388-4.
- Finazzi, G., and Forti, G. (2004). Metabolic flexibility of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by the link between state transitions and cyclic electron flow. *Photosynthesis research*, 82, 327-338.
- Force, L., Critchley, C., et van Rensen, J.J.S. (2003). New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis research*, 78, 17-33.
- Franz, J.E., Mao, M.K., et Sikorski, J.A. (1997). *Glyphosate : a unique global herbicide*. Oxford University Press.
- Gantt, E., Edwards, M.R., et Provasoli, L. (1971). Chloroplast structure of the *cryptophyceae*. *The Journal of cell biology*, 48, 280-290.
- Giroux, I., et Pelletier, L. (2012). *Présence de pesticides dans l'eau au Québec : bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2008, 2009 et 2010*. Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement. ISBN 978-2-550-64159-9.
- Govindjee., Kern, J.F., Messinger, J., Whitmarsh, J. (2010). *Photosystem II*. Dans: *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons. Chichester.
- Helander, M., Saloniemi, I., et Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trend in plant science*, 17(10), 569-574.
- Huang, J., Silva, E.N., Shen, Z., Jiang, B., et Lu, H. (2012). Effects of glyphosate on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and physiochemical properties of coongrass (*Imperata cylindrical* L.). *Plant omics journal*, 5(2), 177-182.
- Jeffrey, S.W., Wright, S.W. et Zapata, M. (2011). *Microalgal classes and their signature pigments*. Dans: *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge University press. 874 pages.



- Joshua, S., and Mullineaux, C.W. (2004). Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in Cyanobacteria. *Plant physiology*, 135, 2112-2119.
- Kaushik, I.S. (2010). Effect of herbicide with different modes of action on physiological and cellular traits of *Anabaena fertilissima*. *Paddy and water environment*, 8, 277-282.
- Kern, J., and Renger, G. (2007). Photosystem II : Structure and mechanism of the water : plastoquinone oxidoreductase. *Photosynthesis research*, 94, 183-202.
- Kitchen, L.M., Witt, W.W., et Rieck, C.E. (1981). Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. *Weed Science*, 29(4), 513-516.
- Lipok, J., Studnik, H., et Gruyaert, S. (2010). The toxicity of Roundup® 360 SL formulations and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73, 1681-1688.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cox, L., Cornejo, J., et Figueroa, M.E. (2009). Effectiveness of glyphosate and imazamox on the control of the invasive cordgrass *Spartina densiflora*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72, 1694-1700.
- Maxwell, K., and Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345), 659-668.
- Muñoz-Rueda, A., Gonzalez-Murua, C., Becerril, J.M., et Sánchez-Díaz, M.F. (1986). Effects of glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] on photosynthetic pigments, stomatal response and photosynthetic electron transport in *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*. *Physiologia Plantarum*, 66, 63-68.
- Perron, M-C., and Juneau, P. (2011). Effect of endocrine disrupters on photosystem II energy fluxes of green algae and cyanobacteria. *Environmental research*, 111, 520-529.
- Raven, P.H., Evert, R.F., et Eichhorn, S.E. (2007). *The biology of plants* (2e édition). Éditions De Boeck Université. Bruxelles.
- Reddy, K.N., Rimando, A.M., et Duke, S.O. (2004). Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 5139-5143.
- Scribner, E.A., Battaglin, W.A., Gilliom, R.J., et Meyer, M.T. (2007). *Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in ground- and surface-water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001-06*: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2007-5122.
- Stein, J. (1972). *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements*. London: Cambridge University Press, 448 p.

- Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. (1995). Polyphasic chlorophyll alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 61(1), 32-42.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Dans: *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, M. Yunus, U. Pathrc et P. Mohanty. London, Taylor & Francis.
- Struger, J., Thompson, D., Staznik, B., Martin, P., McDaniel, T., et Marvin, C. (2008). Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 378-384. DOI 10.1007/s00128-008-9373-1
- Sueoka, N., Chiang, K.S., et Kates, J.R. (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*; Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *Journal of Molecular Biology*, 25, 44-67.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J-R., et Kamiya, N. (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473, 55-60.
- Vendrell, E., Gómez de Barreda Ferraz, D., Sabater, A. et Carrasco, J.M. (2009). Effects of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 538-542.
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science*, 61, 1139-1151.
- Vivancos, P.D., Driscoll, S.P., Bulman, C.A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., Mauve, C., Noctor, G., et Foyer, C.H. (2011). Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependant inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant physiology*, 157, 256-268.
- Wollman, F-A., and Lemaire, C. (1988). Studies on kinase-controlled state transitions in Photosystem II and b<sub>6</sub> f mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* which lack quinone-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 933, 85-94.
- Wong, P.K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, 41, 177-182.
- Yanniccari, M., Tambussi, E., Istilart, C., et Castro, A.M. (2012). Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant physiology and biochemistry*, 57, 210-217.

- Zobiolo, L.H.S., de Oliveira Jr., R.S., Kremer, R.J., et Muniz, A.S. (2010). Nutrient accumulation and photosynthesis in glyphosate-resistant soybeans is reduced under glyphosate use. *Journal of plant nutrition*, 33, 1860-1873.
- Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira Jr., R.S., et Constantin, J. (2011). Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of "second generation" glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 99, 53-60.
- Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., de Oliveira Jr., R.S., et Constantin, J. (2012). Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175, 319-330.



### CHAPITRE III

#### LOW CONCENTRATIONS OF GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE HAVE DELETERIOUS EFFECTS ON A FRESHWATER PHYTOPLANKTON COMMUNITY FROM AN AGRICULTURAL STREAM

ÉLISE SMEDBOL<sup>1</sup>, MARCELO PEDROSA GOMES<sup>1</sup>, SERGE PAQUET<sup>2</sup>, MICHEL  
LABRECQUE<sup>3</sup>, LAURENT LEPAGE<sup>2</sup>, MARC LUCOTTE<sup>2</sup> and PHILIPPE JUNEAU<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université du Québec à Montréal, Département des sciences biologiques –TOXEN,  
Laboratory of Aquatic Microorganism Ecotoxicology, Succ. Centre-Ville, C.P. 8888, H3C  
3P8, Montréal, Québec, Canada

<sup>2</sup> Université du Québec à Montréal, Institut des Sciences de l'environnement, Succ.  
Centre-Ville, C.P. 8888, H3C 3P8, Montréal, Québec, Canada.

<sup>3</sup> Université de Montréal, Institut de recherche en biologie végétale, 4101, rue  
Sherbrooke Est, H1X 2B2, Montréal, Québec, Canada

Correspondance: P. Juneau, E-mail: [juneau.philippe@uqam.ca](mailto:juneau.philippe@uqam.ca) Tel.: +1 514 987 3000

#3988. Fax: +1 514 987 4647

Cet article sera soumis dans la revue scientifique *Aquatic Toxicology*.

### 3.1 Contributions

Élise Smedbol a réalisé le plan d'expérience, l'échantillonnage sur le terrain, les analyses en laboratoire, l'analyse des résultats et la rédaction. Marcelo P. Gomes a contribué à l'échantillonnage sur le terrain, aux analyses en laboratoire et à l'analyse des résultats. Serge Paquet a contribué à l'identification du phytoplancton par microscopie et aux analyses statistiques, alors que Marc Lucotte et Philippe Juneau ont participé à l'élaboration du plan d'expérience, effectué la supervision des travaux de laboratoire et participé à la rédaction du texte, alors que Michel Labrecque et Laurent Lepage ont révisé le texte.

### 3.2 Abstract

Glyphosate-based herbicides are the most used herbicides worldwide. Glyphosate is ubiquitously detected in rural watercourses draining agricultural fields and may affect phytoplankton communities present in these ecosystems. The purpose of this study was to verify the effects of a glyphosate-based herbicide on the phytoplankton community collected in an agricultural stream. After sampling, the phytoplankton community was exposed to increasing glyphosate concentrations (1, 5, 10, 50, 100, 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) for a 96 hours period. At 5 and 10  $\mu\text{g l}^{-1}$  of glyphosate, a modification of the structure of the community occurred and the diversity of the dominant algal groups was reduced. From 50 to 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  of glyphosate, new dominant species appeared, modifying the phytoplankton community composition. Global chlorophyll *a* and carotenoid content were reduced from the smallest concentration of 1  $\mu\text{g l}^{-1}$  and above, as well as the chlorophyll *a/b* ratio along with the increasing glyphosate concentrations, while there was no change in the global chlorophyll *b* content. The chlorophyll *a* and *b* contents per cell were increased at high glyphosate concentrations (500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) and the carotenoid content per cell was decreased from 1  $\mu\text{g l}^{-1}$  and above. The shikimate content and lipid peroxydation also increased along with increasing glyphosate concentrations and enzymes from antioxidant systems (superoxide dismutase, catalase and ascorbate peroxidase) had activities modulated by high glyphosate doses. These results indicated that glyphosate-based herbicides could modify structural and functional properties of freshwater phytoplankton communities living in streams located in agricultural areas, at environmental concentrations of 1  $\mu\text{g l}^{-1}$  and above, which are below the Canadian guidelines for the protection of aquatic life of 65  $\mu\text{g l}^{-1}$ .

**Keywords:** ecotoxicology, diversity index, freshwater phytoplankton, Factor540<sup>®</sup>, oxidative stress, community structure

### 3.3 Résumé

Les herbicides à base de glyphosate sont les plus employés dans le monde. Le glyphosate est omniprésent dans les cours d'eau drainant les champs agricoles, ce qui peut affecter les communautés de phytoplancton présentes dans ces écosystèmes. Le but de cette étude fut de vérifier les effets d'un herbicide à base de glyphosate sur la communauté de phytoplancton

collectée dans un ruisseau agricole. Après l'échantillonnage, la communauté phytoplanctonique fut exposée à des concentrations croissantes de glyphosate (1, 5, 10, 50, 100, 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) pour une période de 96 heures. À des concentrations de 5 et de 10  $\mu\text{g l}^{-1}$  de glyphosate, une modification de la structure de la communauté fut vérifiée et la diversité des groupes algaux dominants fut réduite. À partir de 50  $\mu\text{g l}^{-1}$  et jusqu'à 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ , de nouvelles espèces dominantes sont peu à peu apparues, modifiant la composition naturelle de la communauté de phytoplancton. Les contenus globaux en chlorophylle *a* et en caroténoïdes furent réduits à partir d'une concentration de glyphosate de 1  $\mu\text{g l}^{-1}$ , de même que le ratio chlorophylle *a/b*, avec l'augmentation des concentrations de glyphosate, alors que le contenu global en chlorophylle *b* est resté le même. Le contenu en chlorophylle *a* et *b* par cellule fut augmenté aux concentrations les plus élevées de glyphosate (500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), alors que le contenu en caroténoïdes par cellule fut diminué à partir d'une concentration de 1  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Le contenu en shikimate et la peroxydation des lipides fut augmentée de pair avec l'augmentation des concentrations de glyphosate et les enzymes du système antioxydant (superoxyde dismutase, catalase et ascorbate peroxidase) ont vu leur activité modulée par les fortes concentrations de glyphosate. Ces résultats indiquent que les herbicides à base de glyphosate peuvent modifier les propriétés structurelles et fonctionnelles des communautés phytoplanctoniques natives des ruisseaux en milieu agricole, à des concentrations de glyphosate de 1  $\mu\text{g l}^{-1}$  et plus, soit inférieures à la norme de toxicité de la vie aquatique (65  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) recommandée par le Conseil Canadien des Ministres de l'environnement.

**Mots-clés:** écotoxicologie, indice de diversité, Factor540®, stress oxydatif, communauté de phytoplancton

### 3.4 Introduction

The application of herbicides to control weeds in crops is a major cause of rural aquatic ecosystem contamination (Klöppel *et al.*, 1997). The high solubility of hydrosoluble herbicides, such as glyphosate, facilitate their transport to watercourses (Blanchoud *et al.*, 2007). Glyphosate [*N*-(phosphonomethyl)glycine], also commercially known as Roundup®, is now the most used herbicide worldwide and its importance has been amplified by the introduction of transgenic glyphosate-resistant (GR) crops in 1996 (Duke, 2011). Although it has been characterized as slightly mobile and rapidly biodegradable (Schuette, 1998), a fraction of glyphosate and its by-products, especially the aminomethylphosphonic acid (AMPA), invariably ends up in waterways draining agricultural fields (Kolpin *et al.*, 2006; Borggaard and Gimsing, 2008). Glyphosate toxic effects on non glyphosate-resistant (non-GR) plants occurs by the inhibition of the shikimate pathway via competition with the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) synthase (EC 2.5.1.19), thus preventing the biosynthesis of aromatic amino acids phenylalanine, tyrosine and tryptophan (Helander *et al.*, 2012). Plants exposed to glyphosate also present decreased photosynthetic rates (Duke *et*



*et al.*, 2003) with observed alterations of their chlorophyll content (Zobiolo *et al.* 2011), photochemical reactions (Yannicari *et al.* 2012) and carbon metabolism (Vivancos *et al.* 2011). Moreover, glyphosate is known to induce lipid peroxidation, through production of reactive oxygen species (ROS). As a result, antioxidant system such as the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (GPX) and glutathione reductase (GR) are activated to mitigate this oxidative stress (Miteva *et al.*, 2005, 2010; Sergiev *et al.*, 2006).

Glyphosate toxicity assessments in waterways using algal assays were performed in multiple studies (e.g. Wong, 2000; Tsui et Chu, 2003; Cedergreen and Streibig, 2005; Ma *et al.*, 2006; Vendrell *et al.*, 2009; Kaushik, 2010; Lipok *et al.*, 2010). Although these monospecific tests are useful to understand the physiological impacts of pesticides, they provide limited information on the impact of these substances on natural phytoplankton communities (Lewis, 1995). The "community scale approach" was previously used to assess the impacts of pesticides on microbial or periphyton communities (e.g. Séguin *et al.*, 2001; Schmitt-Jensen and Altenburger, 2005; Stachowski-Haberkorn *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2010; Sura *et al.*, 2012), showing that biotic factors, such as variations of sensitivity among species, can modulate the response of the aquatic microorganism communities towards pesticides (Bérard *et al.*, 1999). These studies focused on the effects of atrazine, nicosulfuron and isoproturon, on periphyton communities (Bérard *et al.*, 1999; Séguin *et al.*, 2001; Schmitt-Jensen and Altenburger, 2005), as well as the effects of herbicide mixture (Sura *et al.*, 2012) on microbial wetlands communities. Concerning glyphosate, Stachowski-Haberkorn *et al.* (2008) showed that a Roundup® concentration of  $1\mu\text{g l}^{-1}$  could induce structural perturbations in prokaryote and eukaryote marine communities, while Vera *et al.* (2010) demonstrated that Roundup® could influence the periphyton colonization in outdoor mesocosms, promoting cyanobacteria colonization at the expense of diatoms. To our knowledge no information exists on the effect of glyphosate-based herbicide at environmental concentrations on natural phytoplankton communities.

The purpose of this study was to evaluate the effect of a glyphosate-based herbicide on a natural phytoplankton assemblage from an agricultural area watercourse, by exposing the phytoplankton community to several glyphosate concentrations in controlled laboratory

conditions. Physiological biomarkers of glyphosate effects on the phytoplankton community, such as the pigment content, the shikimate content and oxidative stress markers (lipid peroxidation and antioxidant enzymes), were evaluated. In addition to these markers, species identification was determined by microscopy to analyze the changes in the community composition and the Shannon's diversity index.

### 3.5 Material and Methods

#### 3.5.1 Sampling and test conditions

The phytoplankton community used in this study was collected from the Dumontier stream (45°36'41.38" N and 73°51'38.55" O), located in southern Quebec (Canada) near the city of Boisbriand, a region of extensive agriculture under the pressure of urban sprawl. The agricultural site, adjacent to the sampled stream, is under soybean and maize rotation, both with genotypes genetically modified to resist to glyphosate. The water sampling was performed at the end of spring, 42 days after glyphosate-based herbicide application.

The water was filtered in the laboratory using nylon mesh (250  $\mu\text{m}$ ) to eliminate filamentous macroalgae and suspended macroparticles. To avoid nutrition constrain, soluble reactive phosphorus, inorganic nitrogen and silicates were added to the collected water, following Bérard (1996). After agitation for several minutes, the pH was checked and corrected to its original value (7.4). Then, to remove zooplankton, water was filtered a second time using a nylon mesh (40  $\mu\text{m}$ ) before being transferred into 500 ml Erlenmeyer flasks.

The pesticide tested in this study was a commercial formulation of the herbicide glyphosate (Factor540®, IPCO, Winnipeg, Manitoba, Canada), which is normally used in the fields adjacent to the sampling site. Concentration values represent those of the pure active substance. A pesticide stock solution of 54  $\text{mg l}^{-1}$  was prepared in 0.22  $\mu\text{m}$  filtered stream water, from the commercial formulation Factor 540®. After agitation, the solution was kept at 4 °C and this solution was added directly into the Erlenmeyer flasks containing filtered phytoplankton samples, in three replicate for each concentration. The glyphosate concentrations (0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) were chosen based on the range of environmental concentrations found in agricultural water streams in Canada and United

States (Scribner *et al*, 2007; Struger *et al*, 2008; Giroux and Pelletier, 2012). Phytoplankton samples were then placed in an environmental growth chamber (MTR30, Conviron, Manitoba, Canada) under similar temperature and light conditions than the ones observed the day before the sampling day (light dark cycle of 16:8 and averaged temperature of 15°C), and agitated manually twice daily (determined with a Hobo temp probe and data logger (Onset, Massachusetts, United States)). The sampling was done after 96 hours of exposure to glyphosate-based herbicide.

To determine glyphosate concentrations originally present in the collected water, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Abraxis LLC, Warminster, Pennsylvania, USA) was performed, with detection limit of 0.05 µg L<sup>-1</sup>.

### 3.5.2 Physiological features

After 96 hours of exposure, the samples from each Erlenmeyer flask were divided into 50 ml Falcon tubes, then frozen at -20°C until physiological measurements. For each measurements, 50 ml of water was filtered using glass microfiber filters grade GF/F: 0.8 µm (©Whatman Ltd.) and the evaluations were made from biomass collected on filters. Dry weight (µg ml<sup>-1</sup>) was performed following Ameen *et al*. (1998), with 50 ml samples been filtrated on rinsed and dried filters, and dried to a constant weight at 103-105°C. The pigments were extracted in methanol. Chlorophyll *a*, *b* and carotenoids content was performed following Wellburn (1994) spectrophotometric method, expressed in % of pigment compared to control and calculated as:

$$\text{Chlorophyll } a = 15.65A_{666} - 7.34A_{653} \quad (3.1)$$

$$\text{Chlorophyll } b = 27.05A_{653} - 11.21A_{666} \quad (3.2)$$

$$\text{Carotenoids} = (1000A_{470} - 2.86 \text{ Chlorophyll } a - 129.2 \text{ Chlorophyll } b) / 221 \quad (3.3)$$

where *A* = Absorbance, calculated at 666, 653 and 470 nm

Oxidative stress was studied by evaluating oxidative responses (lipid peroxidation – malondialdehyde [MDA] content) and antioxidant enzymes (superoxide dismutase – SOD; catalase – CAT; and ascorbate peroxidase – APX). MDA content was evaluated following Heath and Packer (1968). Extractions were made from fresh material collected on filters with trichloroacetic acid (TCA 0.1%) and the spectrophotometric readings were made at absorbance of 535 and 600nm (Marques and Soares. 2011). SOD (EC 1.15.1.1) was evaluated following Beyer and Fridovich (1987); CAT (EC 1.11.1.6) was evaluated following Aebi (1984) and APX (EC 1.11.1.11) was evaluated following Nakano and Asada (1981). For these evaluations, extractions were made from fresh material collected on filters with a potassium phosphate buffer at pH 7.8 and the protein content was determined by the Bradford method. The reading absorbance was 560 nm for SOD, 240 nm for CAT and 290 nm for three minutes at 15 seconds interval (Marques and Soares. 2011). Oxidative stress markers were expressed as following: MDA content ( $\mu\text{M mm}^{-3} \text{ cell}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ ), SOD ( $\text{U mm}^{-3} \text{ cell}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ ), CAT ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mm}^{-3} \text{ cell}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ ) and APX ( $\mu\text{mol ascorbate min}^{-1} \text{ mm}^{-3} \text{ cell}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ ).

The shikimic acid concentrations ( $\mu\text{g mm}^{-3} \text{ cells}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ ) were evaluated following the method of Singh and Shaner (1998), adapted for phytoplankton. Briefly, 50 ml of filtered growth media were resuspended in 3 ml of 0.25 M hydrochloric acid and shaken. Then, the extracts were centrifuged at  $25000 \times g$  for 15 min. The supernatant (100  $\mu\text{l}$ ) was reacted with 1 % solution of periodic acid. After 3 h, 1 ml of 1 M sodium hydroxide and 0.6 ml of 0.1 M glycine were added to the samples. Absorbance was measured at 380 nm.

### 3.5.3 Phytoplankton species determination

After 96 hrs exposure, 50 ml of each homogenized triplicate was preserved in a lugol iodine solution. Then the determination and quantification was carried out at species level as follows: sub-samples of 5 ml were settled into Utermöhl settling chambers (Dawson. 1960; Edler and Elbrächter, 2010) and counted using an IMT2 inverted phase contrast microscope. Counts were carried out on 15 random fields at 600X magnifications for the common pico and nanoplankton species and, at 150X, a cross over the settling chamber for the remaining rare and microplankton species. At least 145 individual cells were counted, for each sample,

to ensure that the error in estimation of cellular abundance remained within the limits of  $\pm 10\%$  (Uehlinger, 1964). Abundance ( $\text{cells ml}^{-1}$ ) and specific biovolume ( $\text{mm}^3 \text{ ml}^{-1}$ ), were estimated based on number of cells, as well as cell measures of length, width and thickness (Lewis, 1976). The dominant species of the phytoplankton community were chosen as the species representing more than 5% of the total biomass. The species determination was then used to calculate the Shannon diversity index ( $H'$ ), using the formula:

$$H' = - \sum p_i \log(p_i) \quad (3.4)$$

where  $p_i$  is the proportion of the total count arising from the  $i$ th species.

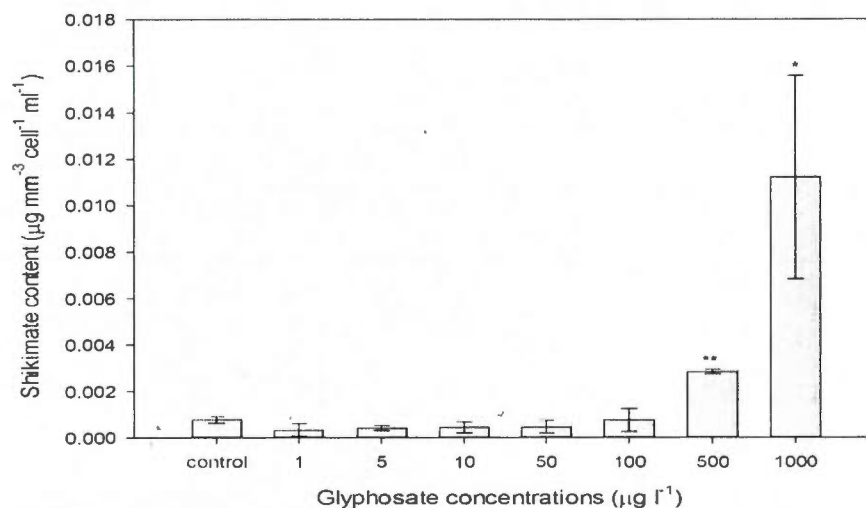
#### 3.5.4 Statistical analysis

Mean comparisons were conducted using the paired T-test, comparing the different treatments (1, 5, 10, 50, 100, 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) to the control treatment, for growth indicators, pigment and shikimate content, as well as enzymatic activity. Data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test and for homogeneity of variances. Except for the dry weight, the other variables did not fulfill these conditions and so, were logarithmically transformed. All statistical analyzes were performed by using JMP 10 software from SAS Institute.

### 3.6 Results

#### 3.6.1 Glyphosate pre-exposure and shikimate content

The presence of glyphosate in the stream water where the phytoplankton sample was initially collected depicted a concentration of  $1 \mu\text{g l}^{-1}$  ( $\pm 0.02 \mu\text{g l}^{-1}$ ) (data not shown). The shikimate content, meanwhile, was measured after glyphosate exposure, showing a significant increase in phytoplankton cells exposed to 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  of glyphosate (figure 3.1).



**Figure 3.1 Shikimate contents in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide.**

### 3.6.2 Growth indicators

Glyphosate effects on the growth indicators of the phytoplankton community were verified. Dry weight and species abundance, decreased for the community exposed to high glyphosate concentrations of 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  (table 3.1). Specific biovolume showed a significant decrease when phytoplankton community was exposed to the highest glyphosate concentration.



**Tableau 3.1** Growth indicators (dry weight [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ], abundance [ $\text{cells ml}^{-1}$ ] and specific biovolume [ $\text{mm}^3 \text{ml}^{-1}$ ]) in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide.

	Glyphosate concentrations ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )							
	Control	1	5	10	50	100	500	1000
Dry weight	69.33 <sup>A</sup> $\pm 14.7$	76.7 <sup>A</sup> $\pm 13.3$	74.7 <sup>A</sup> $\pm 16$	84 <sup>A</sup> $\pm 5.7$	62.7 <sup>A</sup> $\pm 4.2$	73.3 <sup>A</sup> $\pm 7$	41 <sup>B</sup> $\pm 4.2$	34.6 <sup>B</sup> $\pm 4.6$
Abundance	2.3e+4 <sup>A</sup> $\pm 1.5\text{e}+3$	2.4e+4 <sup>A</sup> $\pm 1.1\text{e}+3$	2e+4 <sup>AB</sup> $\pm 1.2\text{e}+3$	2.4e+4 <sup>A</sup> $\pm 2.1\text{e}+3$	1.6e+4 <sup>B</sup> $\pm 1.6\text{e}+3$	1.7e+4 <sup>A</sup> $\pm 4.2\text{e}+3$	1.1e+4 <sup>C</sup> $\pm 3.2\text{e}+3$	9.6e+3 <sup>C</sup> $\pm 1.8\text{e}+3$
Specific Biovolume	3.3e-4 <sup>A</sup> $\pm 8.1\text{e}-4$	4e-4 <sup>A</sup> $\pm 1.2\text{e}-3$	4.4e-4 <sup>A</sup> $\pm 1.1\text{e}-3$	3.9e-4 <sup>A</sup> $\pm 1.3\text{e}-3$	4.3e-4 <sup>A</sup> $\pm 1.5\text{e}-3$	3.3e-4 <sup>A</sup> $\pm 1\text{e}-3$	8.1e-5 <sup>B</sup> $\pm 1.6\text{e}-4$	3.3e-5 <sup>B</sup> $\pm 4.9\text{e}-5$

Treatments means from ANOVA (n=3). Different letters in the same line represents significant differences ( $p < 0.05$ ) by the paired T-test.

### 3.6.3 Pigment content

Chlorophyll *a* content (% of pigment compared to control) significantly decreased for phytoplankton cells exposed to glyphosate concentrations of 1, 5, 100, 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$  (table 3.2). There was no significant difference between the intermediary (10 and 50  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) and the control treatments. The chlorophyll *b* content showed no significant differences when compared to control. Concerning the carotenoid content, there was a significant decrease of carotenoids for all glyphosate concentrations.

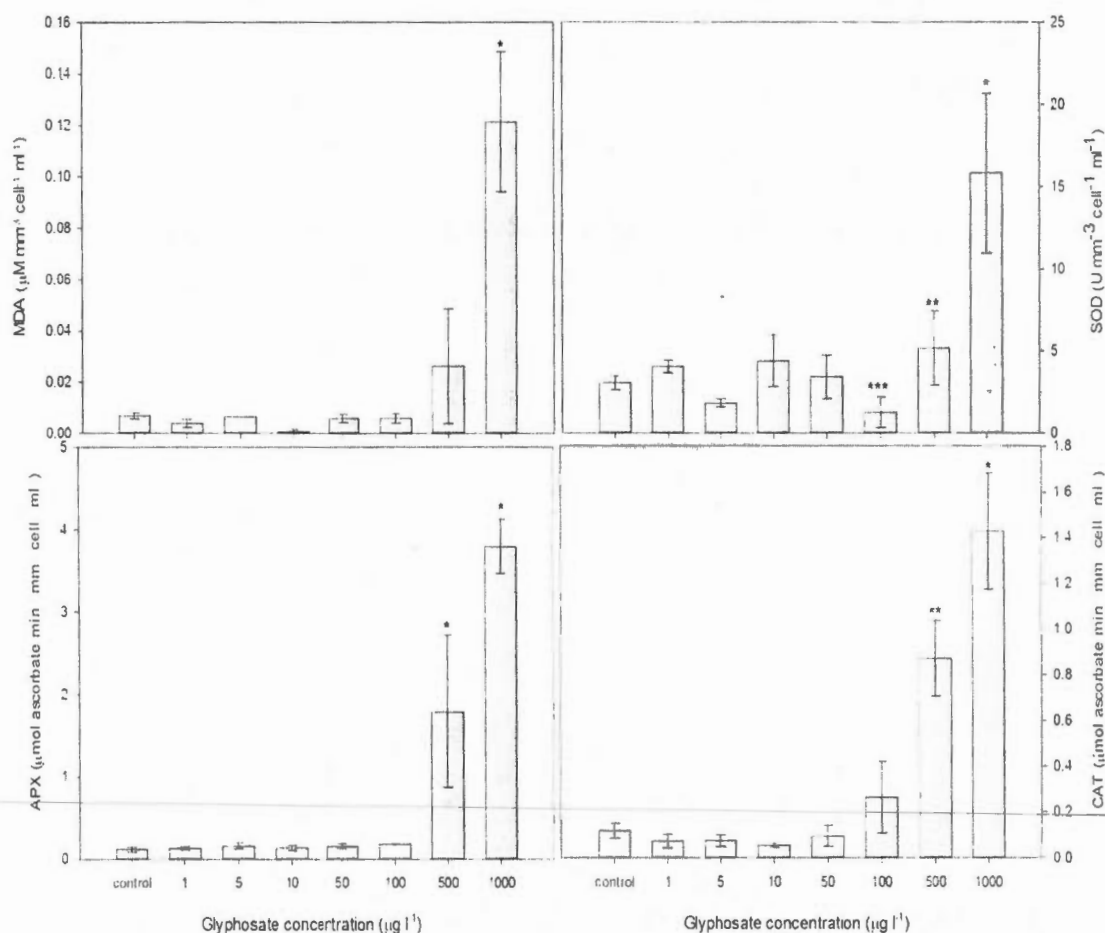
**Tableau 3.2 Chlorophyll *a*, *b* and carotenoids content (% of pigment compared to control) and chlorophyll *a/b* ratio in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide.**

	Glyphosate concentrations ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )							
	Control	1	5	10	50	100	500	1000
Chl <i>a</i>	100 $\pm 0.8$	61.7* $\pm 21$	69.3* $\pm 13$	94.7 $\pm 22$	100.3 $\pm 18$	66.1* $\pm 23$	29.7* $\pm 29$	28* $\pm 4$
Chl <i>b</i>	100 $\pm 0.5$	84.2 $\pm 42$	83.8 $\pm 17$	116.2 $\pm 17$	134.3 $\pm 19$	137.4 $\pm 96$	100.6 $\pm 113$	158.4 $\pm 79$
Carotenoid	100 $\pm 5$	32.9* $\pm 24$	46.9* $\pm 18$	56.2* $\pm 24$	63.4* $\pm 10$	27.4* $\pm 22$	4.3* $\pm 5$	1.1* $\pm 2$

Treatments means from ANOVA (n=3). The \* symbol represents significant differences from the control treatment ( $p < 0.05$ ) by the paired T-test.

#### 3.6.4 Oxidative markers

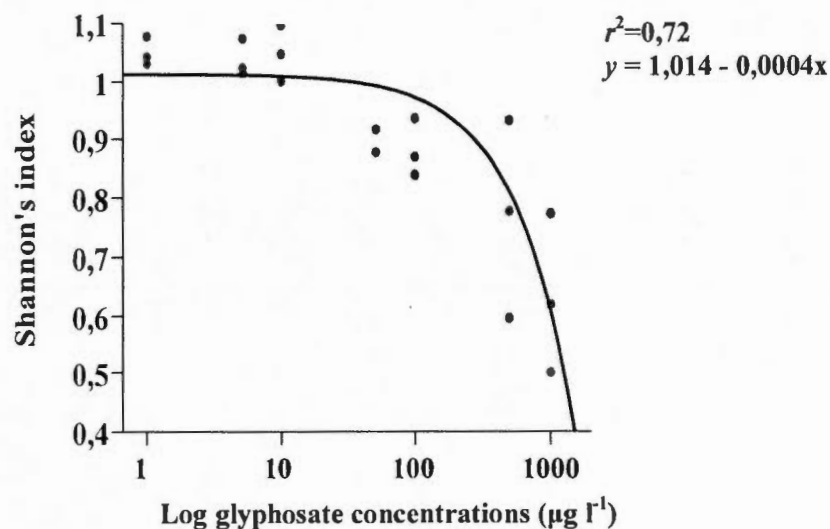
Lipid peroxidation (MDA concentration) was significantly greater for the highest glyphosate concentration, when compared to control (figure 3.2). Regarding antioxidant enzymes, SOD activity increased when glyphosate concentration reached  $500 \mu\text{g l}^{-1}$ , but was significantly lower at a concentration of  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ . Similarly, APX and CAT activities increased for samples treated with glyphosate concentrations of 500 and  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ .



**Figure 3.2** Oxidative stress markers (MDA content, superoxide dismutase [SOD], catalase [CAT] and ascorbate peroxidase [APX]) in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide.

### 3.6.5 Diversity index

A simple regression test between the Shannon diversity index ( $H'$ ) and the glyphosate concentrations indicates that the diversity of the phytoplankton community sampled in the Dumontier stream, (Boisbriand, Quebec, Canada) decreased with the increasing glyphosate concentrations (figure 3.3).



**Figure 3.3** Relationship between the Shannon's diversity index and glyphosate concentrations added to the growth media in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide.

#### 3.6.6 Interspecific variations

As shown in figure 3.4 (A), the phytoplankton community was composed of six dominant phytoplankton classes. The control treatment was dominated by the *Chlorophyceae* (40%), *Bacillariophyceae* (25%), *Chrysophyceae* (22%) and *Chryptophyceae* (10%) classes. *Euglenophyceae* (0.8%) and *Cyanobacteria* (2.2%) presence was marginal. The relative biomass of *Chrysophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Euglenophyceae* and *Cryptophyceae* gradually decreased up to a glyphosate concentration of  $100 \mu\text{g l}^{-1}$ , while the relative biomass of *Chlorophyceae* was increased. Above  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  of glyphosate, the relative biomass of *Chlorophyceae* decreased, while an increase was observed for the other four phytoplankton classes. At the highest glyphosate concentration ( $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ ), the phytoplankton community was composed of *Bacillariophyceae* (35%), *Chryptophyceae* (30%), *Chrysophyceae* (14.5%), *Chlorophyceae* (12.7%), *Euglenophyceae* (5.6%) and *Cyanobacteria* (2%).

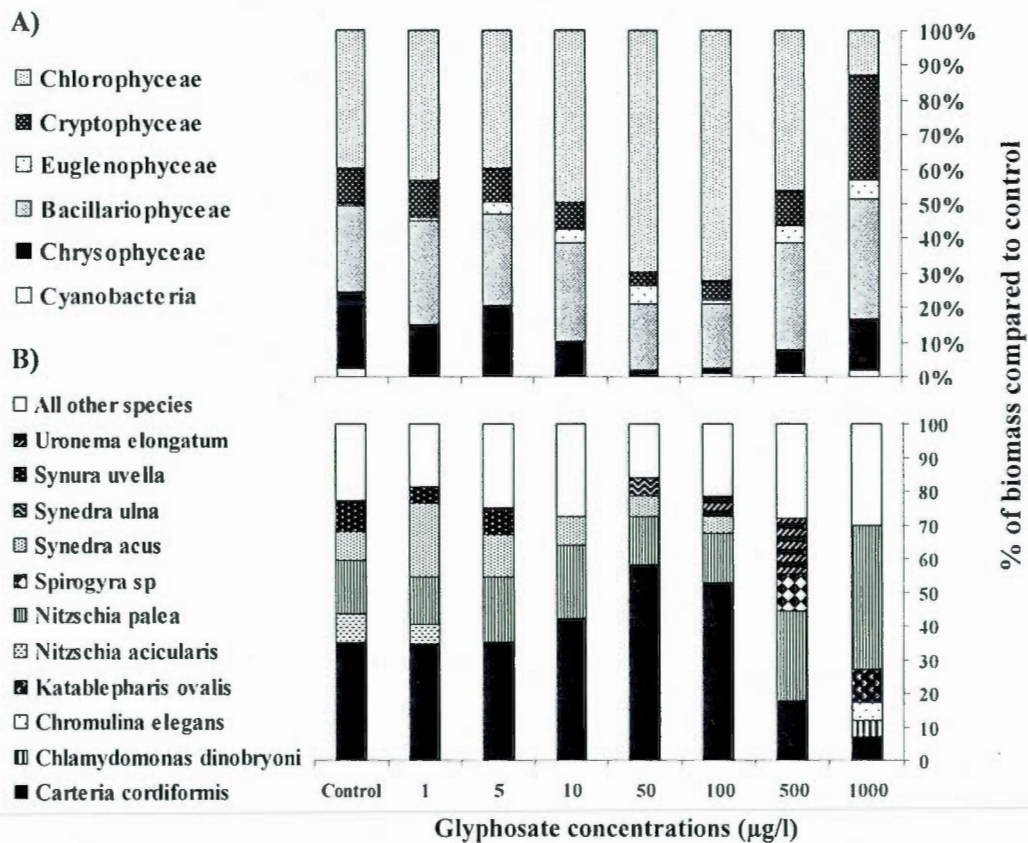


Figure 3.4. Relative biomass of the six major phytoplankton classes (A) and major phytoplankton species (more than 5% of total biomass) (B) in an agricultural stream phytoplankton community after a 96 hours exposure to various concentrations of glyphosate-based herbicide.

Figure 3.4 (B) shows the shift in the composition of the phytoplankton species when exposed to different concentrations of glyphosate for 96 hours. We detected five dominant species for the control (*Carteria cordiformis* [35%], *Nitzschia palea* [16%], *Synedra uvella* [9%], *Nitzschia acicularis* [8%] and *Synedra acus* [8%]). With glyphosate concentrations equal or above  $5 \mu\text{g l}^{-1}$ , *N. acicularis* biomass decreased below 5%. Similar results were obtained for *S. uvella*, for glyphosate concentrations equal or above  $10 \mu\text{g l}^{-1}$ . When glyphosate concentrations reached  $500 \mu\text{g l}^{-1}$  and above, *S. acus* proportion in the community was also

reduced below 5% of total biomass. New species appeared to be representative in the community, in treatments equal or above 50  $\mu\text{g}$  glyphosate  $\text{l}^{-1}$ . Indeed, *Synedra ulna*'s presence, with a biomass higher than 5%, was only found at 50  $\mu\text{g}$  glyphosate  $\text{l}^{-1}$ , *Uronema elongatum* was significantly present at 100 and *Spirogyra* sp. Was found to be a dominant specie at 500  $\mu\text{g}$  glyphosate  $\text{l}^{-1}$ . The phytoplankton community encountered at 1000  $\mu\text{g}$  glyphosate  $\text{l}^{-1}$  was quite different from the control treatment, with the diatom *Nitzschia palea* as the dominant species (43%) and with the apparition of three new species: *Kateblepharis ovalis* (10%), *Chromulina elegans* (5.3%) and *Chlamydomonas dinobryoni* (5.1%). The proportion of the green alga *Carteria cordiformis* started to decrease at 500  $\mu\text{g}$  glyphosate  $\text{l}^{-1}$  and above, showing that this species is only sensitive to high glyphosate concentrations.

### 3.7 Discussion

Even if the water sampling was collected 42 days after the last glyphosate application in the closest field to the stream, glyphosate concentrations of around 1  $\mu\text{g}$   $\text{l}^{-1}$  were measured. The concentration found in the sampled water was in accordance with environmental concentrations found in agricultural streams (Giroux et Pelletier, 2012), and much lower than the Canadian watercourse guideline value of 65  $\mu\text{g}$  glyphosate  $\text{l}^{-1}$  (CCME, 2008).

The negative correlations between glyphosate concentrations and growth indicators, dry weight and cell abundance, indicates the hazardous effects of this herbicide to the phytoplankton community. Cell growth and division were affected by the presence of glyphosate, as showed by the decrease of the abundance and dry weight, as well as the specific cell biovolume. Our results are in accordance with previous studies on glyphosate effect on phytoplankton growth (Christy *et al.*, 1981; Tsui and Chu, 2003; Ma *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2011).

On top of its effects on growth, glyphosate can also affect important physiological processes in plants such as photosynthesis (Zobiolo *et al.*, 2010, 2011 and 2012; Yannicari *et al.*, 2012) and might affect chlorophyll synthesis. Kitchen *et al.* (1981) hypothesized that chlorophyll accumulation in plants was affected by glyphosate exposure, either by inhibition of chlorophyll biosynthesis or by chlorophyll degradation. Zaidi *et al.* (2005) suggested that glyphosate could inhibit the formation of  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA), the porphyrin



precursor which is necessary for the biosynthesis of chlorophylls, but this hypothesis has not yet been verified experimentally. In higher terrestrial plants, the first visible signs of glyphosate exposure are the chlorosis of the leaves, created by oxidative events, which damages chloroplasts membranes (Kitchen *et al*, 1981; Zaidi *et al*, 2005). In our study, increasing concentrations of glyphosate resulted in reduced phytoplankton community chlorophyll *a* and carotenoid content, but triggered no detectable effect on the chlorophyll *b* content. The destruction of the membrane by reactive oxygen species, thus reducing the chloroplast integrity and function, would have also reduced the chlorophyll *b* concentration since these pigments are located in the thylakoid membranes of chloroplast along with the other photosynthetic pigments. In our study there was no significant decrease of the total chlorophyll *b* concentration in the phytoplankton community.

However, lipid peroxidation did occur at the highest glyphosate exposure and the antioxidant response was activated as shown by the increased amount of antioxidant enzymes and activity, expressing the presence of oxidative events affecting the cells integrity, but this phenomenon cannot explain by itself the changes of concentrations of total pigments. Wong (2000) determined that a glyphosate concentration of 20 mg l<sup>-1</sup> and higher could affect the chlorophyll *a* synthesis in the green alga *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. Our study highlights the effects of increasing concentrations of glyphosate on the phytoplankton community, not only on chlorophyll *a* concentrations, but also on carotenoid content, at low glyphosate concentrations. The global chlorophyll *a* and carotenoids concentrations were significantly reduced when exposed to glyphosate concentrations of 1 µg l<sup>-1</sup> and above, while there was no change of the global concentration of chlorophyll *b*.

The phytoplankton community structure was also different than from the control treatment, at glyphosate-based herbicide concentrations as low as 5 µg l<sup>-1</sup> with the apparition of new dominant species, such as *Nitzschia palea*, *Kateblepharis ovalis*, *Chromulina elegans* and *Chlamydomonas dinobryoni*, from 50 µg l<sup>-1</sup>. The dominant phytoplankton groups of the community were also modified, since the dominance of the *Chlorophyceae* class in the control treatment was replaced by the *Cryptophyceae*, *Crysophyceae* and *Bacillariophyceae* classes at higher glyphosate concentrations. These results imply that some phytoplankton species might be resistant to glyphosate-based herbicides. However, it is also possible to

think that resistant species were best adapted to the test conditions (light and temperature), explaining their dominance in the community when a stressor (herbicide) was added to the microcosms. Indeed, cyanobacteria, for example, were almost absent of the sampled phytoplankton community, a phenomenon that could be explained by the low temperature at the sampling period (15°C), since they prefer warmer waters, while diatoms generally prefer cold waters. Bérard and Benninghoff (2001) found that, in addition to atrazine, seasonal factors would influence the species composition in phytoplankton community, cyanobacteria being more present in summer and diatoms in spring.

An increase of the shikimate content was verified after 96 hours of exposure to glyphosate-based herbicide, at high glyphosate concentrations of 500 and 1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ , meaning that the shikimate pathway was inhibited by glyphosate, leading to an accumulation of shikimate-3-phosphate in chloroplasts. This result also proves that the shikimate content can be used as a biomarker of the effects of glyphosate-based herbicides on phytoplankton communities. To our knowledge, the accumulation of shikimate in phytoplankton cells was never verified experimentally.

Along with this specific inhibition target site, the glyphosate action also leads to oxidative events in plants which are most probably the secondary effect of the blocked shikimate pathway (Ahsan *et al.*, 2008). Among the enzymatic systems, ROS-scavenging enzymes are frequently used as indicators of oxidative stress (Gunes *et al.*, 2007), along with MDA (Mittler, 2002). Although changes in these oxidative stress markers have been reported in plants exposed to glyphosate (Kielak *et al.*, 2011; Miteva *et al.*, 2010), little information is currently available concerning the effects of glyphosate on phytoplankton oxidative events. We found that, at high concentrations, glyphosate induced oxidative stress, as measured by lipid peroxidation. However, we noticed that some phytoplankton species (*Nitzschia palea*, *Kateblepharis ovalis*, *Chromulina elegans* and *Chlamydomonas dinobryoni*) were present in these samples indicating that these species developed some tolerance which could be associated to the activation of antioxidant systems. In fact, we verified increased activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and APX) in phytoplankton exposed to high glyphosate concentrations. SOD is the major scavenger of superoxide anions ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) and provides the first line of defense against cell injury by environmental factors (Gratao *et al.*, 2005). Hydrogen

peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), produced by SOD activity, is in turn scavenged by CAT and APX (Gunes *et al.*, 2007). Increased activity of these enzymes could help some phytoplankton species to cope with ROS generation and ROS-induced burst, although this was not sufficient to avoid lipid peroxidation.

De Lorenzo *et al.* (1999) mentioned that phytoplankton community structure and functional aspects were altered when exposed to atrazine, deethylatrazine, endosulfan and chlorpyrifos, these pesticides inducing compositional shifts in photoautotroph species. Our results indicate that glyphosate-based herbicide, Factor540<sup>®</sup>, also did alter the physiological and structural aspects of the freshwater phytoplankton community, as expressed by the changes of the chlorophyll *a* and of changes in the dominant species of the community. Overall, the Shannon diversity index decreased following the increase of glyphosate concentrations, which indicates a loss of species diversity of the phytoplankton community when exposed to the herbicide glyphosate (figure 3.3). An exposure to low concentrations of glyphosate-based herbicide (5 and 10  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) reduced the diversity of the phytoplankton dominant species, while glyphosate concentrations of 50  $\mu\text{g l}^{-1}$  and higher favored the appearance of new species becoming dominant.

### 3.8 Conclusion

Glyphosate negatively affects freshwater phytoplankton community from the studied agricultural stream. A progressive decrease in biodiversity was clearly identified by the decrease of the Shannon's index when the original phytoplankton community was exposed to increasing glyphosate concentrations. However, some phytoplankton species, such as *Nitzschia palea* proved to be resistant at high glyphosate concentrations, becoming dominant under these conditions. These results indicates that glyphosate-based herbicides affects the structure of phytoplankton community at low concentrations that are representative of environmental concentrations as monitored in different studies (Giroux et Pelletier, 2012; Scribner *et al.*, 2007; Struger *et al.*, 2008; Dubois *et al.*, 2010). The observed short-term effects of low concentrations of glyphosate-based herbicides on freshwater phytoplankton communities, questions the effectiveness of the chronic toxicity standard for aquatic life (65  $\mu\text{g l}^{-1}$  of glyphosate; CCME, 2008) for risk management of glyphosate-based herbicides.

Finally, our study highlights the hypothesis that the toxic effects of glyphosate on phytoplankton might be linked to the perturbation of the photosynthetic apparatus.

### 3.9 Acknowledgments

This research was made possible by the financial support of the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC), awarded to the Prof. M. Lucotte, P. Juneau, M. Labrecque and L. Lepage, through the strategic project grant SABRE (*Salix en Agriculture pour des Bandes Riveraines Énergétiques*). The authors would also like to thank Irina Moukhina for the phytoplankton species determination.



### 3.10 References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Ahsan, N., Lee, D-G., Alam, I., Lee, A-H., Bahk, J.D., et Lee, B-H. (2008). Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant physiology and biochemistry*, 46(12), 1062-1070.
- Ameel, J., Ruzycki, E. and Axler, R.P. (1998). *Analytical chemistry and quality assurance procedures for natural water samples*. 6<sup>th</sup> edition. Central analytical laboratory, NRRI Tech. Rep. NRRI/TR-98/03 revised annually.
- Bérard, A. (1996). Effect of four organic solvents on natural phytoplankton assemblages: Consequences for ecotoxicological experiments on herbicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(2), 183-190.
- Bérard, A. and Benninghoff, C. (2001). Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. *Chemosphere*, 45, 427-437.
- Bérard, A., Leboulanger, C., et Pelte, T. (1999). Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to atrazine in natural phytoplankton populations and in pure culture: Influence of season and temperature. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 37, 472-479.
- Beyer Jr., W.F., and Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*, 161(2), 559-566.
- Blanchoud, H., Moreau-Guignon, E., Farrugia, F., Chevreuil, M., et Mouchel, J.M. (2007). Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed. *Science of the total environment*, 375, 168-179.
- Borggaard, O.K., and Gimsing, A.L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64, 441-456.
- Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement. (2008). *Recommandations pour la qualité des eaux au Canada*. Ottawa. Ontario.
- Cedergreen, N., and Streibig, J.C. (2005). The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Management Science*, 61, 1152-1160.
- Christy, S.L., Karlander, E.P., et Parochetti, J.V. (1981). Effects of glyphosate on the growth rate of *Chlorella*. *Weed Science*, 29(1), 5-7.



- Dawson, W.A. (1960). Home-made counting chambers for the inverted microscope. *Limnology and oceanography*, 5 (2): 235-236.
- DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., et Ross, P.E. (1999). Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. *Environmental toxicology and chemistry*, 18(12): 2824-2835.
- Dubois, A., Lacouture, L., et Feuillet, C. (2010). *Les pesticides dans les milieux aquatiques, données 2007*. Commissariat général au développement durable, Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la mer. France. Récupéré dans <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Les-pesticides-dans-les-milieux.html>
- Duke, S.O. (2011). Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 5835-5841.
- Edler, L., and Elbrächter, M. (2010). *The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis*. In: Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Intergovernmental oceanographic commission. UNESCO.
- Finazzi, G., and Forti, G. (2004). Metabolic flexibility of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by the link between state transitions and cyclic electron flow. *Photosynthesis research*, 82, 327-338.
- Giroux, I., et Pelletier, L. (2012). *Présence de pesticides dans l'eau au Québec : bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2008, 2009 et 2010*. Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement. ISBN 978-2-550-64159-9.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., et Azevedo, R.A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional plant biology*, 32(6), 481-494.
- Gunes, A., Inal, A., Bagci, E.G., et Pilbeam, D.J. (2007). Silicon-mediated changes of some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach and tomato grown in sodic-B toxic soil. *Plant and soil*, 290(1-2), 103-114.
- Heath, R.L., and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198.
- Helander, M., Saloniemi, I., et Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trend in plant science*, 17(10), 569-574.
- Kaushik, I.S. (2010). Effect of herbicide with different modes of action on physiological and cellular traits of *Anabaena fertilissima*. *Paddy and water environment*, 8, 277-282.

- Kielak, E., Sempruch, C., Mioduszevska, H., Klocek, J., et Leszczyński, B. (2011). Phytotoxicity of Roundup Ultra 360 SL in aquatic ecosystems : Biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99, 237-243.
- Kitchen, L.M., Witt, W.W., et Rieck, C.E. (1981). Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. *Weed Science*, 29(4), 513-516.
- Klöppel, H., Wördel, W., et Stein, B. (1997). Herbicide transport by surface runoff and herbicide retention in a filter strip, rainfall and runoff stimulation studies. *Chemosphere*, 35(1/2), 129-141.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E.A., Meyer, M.T., Furlong, E.T., et Glassmeyer, S.T. (2006). Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the total environment*, 354, 191-197.
- Lewis, M.A. (1995). Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental pollution*, 87, 319-336.
- Lewis Jr., W.M. (1976). Surface/Volume ratio: Implications for phytoplankton morphology. *Science*, 192, 885-887.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., et Xu, R. (2006). Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63, 456-462.
- Marques, T.C.L.L.S.M.M., and Soares, A.M. (2011). Antioxidant system of ginseng under stress by cadmium. *Scientia agricola*, 68(4): 482-488.
- Miteva, L.P-E, Ivanov, S.V., et Alexieva, V.S. (2010). Alterations in glutathione pool and some related enzymes in leaves and roots of pea plants treated with the herbicide. *Russian journal of plant physiology*, 57(1), 131-136.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9): 405-410.
- Muñoz-Rueda, A., Gonzalez-Murua, C., Becerril, J.M., et Sánchez-Díaz, M.F. (1986). Effects of glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] on photosynthetic pigments, stomatal response and photosynthetic electron transport in *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*. *Physiologia Plantarum*, 66, 63-68.
- Nakano, Y., and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Romero, D.M., Ríos de Molina, M.C., et Juárez Á.B. (2011). Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74, 741-747.

- Séguin, F., Druart, J-C., et Le Cohu, R. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on periphytic diatom communities in freshwater outdoor lentic mesocosms. *Annales de Limnologie*, 37(1), 3-8.
- Schmitt-Jensen, M., and Altenburger, R. (2005). Toxic effects of isoproturon on periphyton communities – a microcosm study. *Estuarine coastal and shelf science*, 62, 539-545.
- Schuette, J. (1998). *Environmental fate of glyphosate*. Environmental monitoring & pest management, Department of pesticide regulation. Sacramento. United States. Récupéré dans <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/glyphos.pdf>
- Scribner, E.A., Battaglin, W.A., Gilliom, R.J., et Meyer, M.T. (2007). *Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in ground- and surface-water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001-06*: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2007-5122.
- Sergieiev, I.G., Alexieva, V.S., Ivanov, S.V., Moskova, I.I., et Karanov, E.N. (2006) The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85(3), 139-146.
- Singh, B.K., and Shaner, D.L. (1998). Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed technology*, 12, 527-530.
- Stachowski-Haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L. et de la Broise, D. (2008). Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquatic toxicology*, 89, 232-241.
- Struger, J., Thompson, D., Staznik, B., Martin, P., McDaniel, T., et Marvin, C. (2008). Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 378-384. DOI 10.1007/s00128-008-9373-1
- Sura, S., Waiser, M., Tumber, V., et Farenhorst, A. (2012). Effects of herbicide mixture on microbial communities in prairie wetland ecosystems: A whole wetland approach. *Science of the total environment*. 435-336, 34-43.
- Tsui, M.T.K., and Chu, L.M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 1189-1197.
- Uehlinger, V. (1964). Étude statistiques des méthodes de dénombrement planctonique. *Archives des Sciences, Société De physique Et d'Histoire naturelle De Genève*, 17(2), 121-233.
- Vendrell, E., Gómez de Barreda Ferraz, D., Sabater, C. et Carrasco, J.M. (2009). Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 538-542.

- Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G.L., Rodríguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferrarro, M., Bonetto, A., Zagarese, H., et Pizarro, H. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19, 710-721.
- Vivancos, P.D., Driscoll, S.P., Bulman, C.A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., Mauve, C., Noctor, G., et Foyer, C.H. (2011). Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependant inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant physiology*, 157, 256-268.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144, 307-313.
- Wong, P.K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, 41, 177-182.
- Yanniccari, M., Tambussi, E., Istilart, C., et Castro, A.M. (2012). Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant physiology and biochemistry*, 57, 210-217.
- Zaidi, A., Khan, Md.S., et Rivzi, P.Q. (2005). Effect of herbicides on growth, nodulation and nitrogen content of greengram. *Agron. Sustain. Dev.*, 25, 497-504.
- Zobiolo, L.H.S., de Oliveira Jr., R.S., Kremer, R.J., et Muniz, A.S. (2010). Nutrient accumulation and photosynthesis in glyphosate-resistant soybeans is reduced under glyphosate use. *Journal of plant nutrition*, 33, 1860-1873.
- Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira Jr., R.S., et Constantin, J. (2011). Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of "second generation" glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 99, 53-60.
- Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., de Oliveira Jr., R.S., et Constantin, J. (2012). Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175, 319-330.



## CONCLUSION GENERALE

Dans cette étude, nous avons évalué la toxicité d'un herbicide à base de glyphosate, le Factor540®, sur les algues et les cyanobactéries en employant deux approches différentes, mais complémentaires. La première, présenté au Chapitre II de ce mémoire, est le développement de bioessais algaux monospécifiques, basés sur le taux de croissance et sur la photosynthèse. Les résultats ont démontré, pour la première fois, que les paramètres photosynthétiques du modèle des flux d'énergie développé par Force *et al*, (2003) sont des indicateurs sensibles de l'exposition au glyphosate chez les algues et cyanobactéries. En effet, les flux d'énergie transitant dans le photosystème II de ces organismes furent modifiés, avec des différences marquées entre les algues et les cyanobactéries. Cela suggère que les herbicides à base de glyphosate peuvent affecter la capacité photochimique de ces organismes photoautotrophes et d'autres études seront nécessaires dans le but de bien comprendre les mécanismes physiologiques impliqués. Par exemple, il serait intéressant d'évaluer les effets du glyphosate sur la synthèse de la protéine D1, dont le résidu tyrosine participe activement au transport d'électron dans le photosystème II.

Au niveau du taux de croissance, cinq espèces d'algues ont démontré une inhibition de 10% de leur taux de croissance, à des concentrations inférieures à 10 µg l<sup>-1</sup>, ce qui correspond aux concentrations de glyphosate retrouvées dans l'environnement au Québec, en Ontario et aux Etats-Unis, rapportées par différent suivis réalisés dans les eaux de ruissellement, les eaux de surface et les eaux du sol. De plus, ces concentrations sont aussi inférieures au Critère de toxicité de la vie aquatique chronique (CVAC) de 65 µg l<sup>-1</sup>, qui est la norme canadienne de protection de la vie aquatique (CCME. 2012). Ces résultats sont surprenants et s'expliquent probablement par le fait que nous avons utilisé un herbicide à base de glyphosate pour faire ces tests, plutôt que le glyphosate pur. En effet, le CVAC est basé sur les tests toxicologiques effectués avec le glyphosate pur, malgré que celui-ci ne soit jamais appliqué en agriculture sous sa forme purifié, mais toujours en mélanges dans diverses formulations commerciales.



Cette recherche démontre donc l'importance de prendre en compte la toxicité du mélange commercial et non simplement de la molécule de glyphosate.

La deuxième approche, à l'échelle de la communauté, fut présentée au Chapitre III, où la mesure de différents indicateurs physiologiques tels que la croissance, le contenu en pigments photosynthétiques, le stress oxydatif et le contenu en shikimate, on démontré une sensibilité suite à l'exposition à l'herbicide Factor540® à base de glyphosate, mais seulement aux concentrations élevées. La composition des espèces dominantes de la communauté phytoplanctonique s'est avérée être un indicateur beaucoup plus sensible de l'exposition au glyphosate. En effet, la structure de la communauté fut modifiée par une faible exposition à l'herbicide, à partir de 5 µg l<sup>-1</sup>, certaines espèces étant très sensibles. Ces résultats sont importants, car ils démontrent une sensibilité accrue à l'échelle de la communauté, par rapport aux tests monospécifiques. Si les tests monospécifiques sont intéressants pour isoler l'effet précis d'un polluant sur un organisme ciblé, les bioessais à l'échelle d'une communauté permettent, quant à eux, de mieux comprendre les interactions entre les différentes populations, de même que la résilience des communautés lors de l'introduction d'un polluant dans le milieu naturel.

## APPENDICE A

**Tableau A.1 Comparaison entre la toxicité du glyphosate seul et celle du glyphosate combiné avec différents surfactants dans les mélanges commerciaux**

Organismes testés	Toxicité accrue due à l'ajout de surfactants	Références
Phytoplancton	Diminution accrue du taux de croissance	Lipok <i>et al.</i> 2010
Crustacés	Inhibition de la croissance plus marquée (IC50)	Tsui et Chu. 2003
Amphibiens	Taux de mortalité plus élevé pour les embryons de grenouilles	Perkins <i>et al.</i> 2000
Poissons	Mortalité plus élevée	Folmar <i>et al.</i> 1979
Lignées cellulaires humaines	Inhibition de la croissance plus marquée (IC50) Perturbation endocrinienne Dommages à la membrane cellulaire	Gasnier <i>et al.</i> 2009 Benachour et Séralini. 2009

Tableau A.2 Equations for log-log regressions in Chapter I

Species	Parameters					
	Growth	F <sub>V</sub> /F <sub>M</sub>	ABS/RC	DI <sub>O</sub> /RC	TR <sub>O</sub> /RC	ET <sub>O</sub> /RC
<i>Microcystis aeruginosa</i> , UTCC632	y=-101.28x + 89.18	y=-33.05x + 96.34	y= 113.71x + 108.77	y=183.34x+ 113.36	y=- 2.26x + 100.58	y= -81.10x + 92.94
<i>Microcystis aeruginosa</i> , UTCC299	y= -84.80x + 84.72	y=-16.69x + 101.75	y = 53.77x + 101.85	y = 95.52x + 104.01	y= 0.92x + 99.21	y = -52.74x + 99.29
<i>Microcystis</i> sp.	y=- 96.91x + 80.55	y=-23.97x + 99.72	y = 126.91x + 98.07	y=246.22x + 91.38	y= 8.44x + 99.09	y = -76.85x + 95.66
<i>Scenedesmus obliquus</i>	y=- 77.16x + 68.68	y=-30.84x + 98.63	y = 237.93x + 101.15	y=610.16x + 98.94	y=41.40x + 102.32	y= -42.82+ 104.03
<i>Ankistrodesmus falcatus</i>	y=- 55.30x + 94.76	y = 11.66x + 101.32	y = 24.61x + 92.36	y = 23.89x + 84.79	y= 20.78x + 97.57	y = 5.70x + 102.72
<i>Oocystis solitaria</i>	y= - 94.88x + 83.34	y=-37.81x + 100.28	y = 227.53x + 85.30	y=518.66x + 68.15	y =48.12x + 95.87	y = -50.63x + 106.43
<i>Chlamydomonas snowii</i>	y = -55.57x + 95.07	y=-23.27x + 101.07	y = 390.25x + 71.25	y=979.94x + 27.32	y= 93.86x + 94.58	y =- 41.80x + 105.47
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , UTCC125	y= - 78.29x + 95.45	y=-13.30x + 100.48	y = 168.18x + 95.96	y=447.45x + 89.51	y= 42.99x + 99.01	y = -32.11x + 104.47
<i>Cryptomonas obovata</i>	y=-101.72x + 111.77	y=- 8.27x + 101.79	y = 26.45x + 95.53	y = 53.47x + 90.95	y= 10.38x + 98.25	y = 5.52x + 101.13

## LISTE DES RÉFÉRENCES

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Ahsan, N., Lee, D-G., Alam, I., Lee, A-H., Bahk, J.D., et Lee, B-H. (2008). Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant physiology and biochemistry*, 46(12), 1062-1070.
- Ameel, J., Ruzycki, E. and Axler, R.P. (1998). *Analytical chemistry and quality assurance procedures for natural water samples*. 6<sup>th</sup> edition. Central analytical laboratory, NRRI Tech. Rep. NRRI/TR-98/03 revised annually.
- Ayoola, S.O. (2008). Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. *African Journal of agricultural research*, 3(12), 825-834.
- Bellaloui, N., Reddy, K.N., Zablotowicz, R.M., Abbas, H.K., et Abel, C.A. (2009). Effects of glyphosate application on seed iron and root ferric (III) reductase in soybean cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57, 9569-9574.
- Benachour, N., and Séralini, G-E. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22, 97-105.
- Barbagallo, R.P., Oxborough, K., Pallett, K.E., et Baker, N.R. (2003). Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant physiology*, 132, 485-493.
- Bérard A. (1996). Effect of four organic solvents on natural phytoplankton assemblages: Consequences for ecotoxicological experiments on herbicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(2), 183-190.
- Bérard, A. and Benninghoff, C. (2001). Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. *Chemosphere*, 45, 427-437.
- Bérard, A., Leboulanger, C., et Pelte, T. (1999). Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to atrazine in natural phytoplankton populations and in pure culture : Influence of season and temperature. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 37, 472-479.
- Bernards, M.L., Thelen, K.D., Penner, D., Muthukumaran, R.B., et McCracken, J.L. (2005). Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation. *Weed Science*, 53, 787-794.

- Beyer Jr., W.F., and Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*, 161(2), 559-566.
- Blanchoud, H., Moreau-Guignon, E., Farrugia, F., Chevreuil, M., et Mouchel, J.M. (2007). Contribution by urban and agricultural pesticide uses to water contamination at the scale of the Marne watershed. *Science of the total environment*, 375, 168-179.
- Borggaard, O.K., and Gimsing, A.L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*, 64, 441-456.
- Cakmak, I., Yazici, A., Tutus, Y., et Ozturk, L. (2009). Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *European Journal of agronomy*, 31, 114-119.
- Cedergreen, N. and Olsen, C.F. (2010). Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide biochemistry and physiology*, 96, 140-148.
- Cedergreen, N., and Streibig, J.C. (2005). The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest management science*, 61, 1152-1160.
- Choi, C.J., Berges, J.A., et Young, E.B. (2012). Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: Variable response among freshwater microalgae. *Water research*, 46, 2615-2626.
- Christy, S.L., Karlander, E.P., et Parochetti, J.V. (1981). Effects of glyphosate on the growth rate of *Chlorella*. *Weed Science*, 29(1), 5-7.
- Commission européenne. (2002). *Review report for the active substance glyphosate*. 6511/VI/99-final. Récupéré dans [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1\\_glyphosate\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list1_glyphosate_en.pdf)
- Conseil canadien des ministres des ressources et de l'environnement. (2008). *Recommandations pour la qualité des eaux au Canada*. Ottawa. Ontario.
- Conseil canadien des ministres de l'environnement. (2012). *Scientific Criteria Document for the Development of the Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Glyphosate*. Winnipeg. Canada. ISBN 978-1-896997- 83-4.
- Couture, G., Legris, J., et Langevin, R. (1995). *Évaluation des impacts du glyphosate utilisé en milieu forestier*. Québec, Ministère des Ressources naturelles, ISBN 2-550-24870-8.
- Dau, H. (1994). Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochemistry and photobiology*, 60(1), 1-23.

- Dawson, W.A. (1960). Home-made counting chambers for the inverted microscope. *Limnology and oceanography*, 5 (2): 235-236.
- Deblois, C.P., Dufresne, K., et Juneau, P. (2013). Response to variable light intensity in photoacclimated algae and cyanobacteria exposed to atrazine. *Aquatic toxicology*, 126, 77-84.
- DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., et Ross, P.E. (1999). Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. *Environmental toxicology and chemistry*, 18(12): 2824-2835.
- DeLorenzo, M.E., Scott, G.I., et Ross, P.E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(1): 84-98.
- Dewick, P.M. (1998). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural product reports*, 11, 173-203.
- Ding, W., Reddy, K.N., Zablotowicz, R.M., Bellaloui, N., et Bruns, H.A. (2011). Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. *Chemosphere*, 83, 593-598.
- Dion, S. (2007). *Guide de classement des ingrédients actifs par groupes chimiques*. Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. ISBN 978-2-550-50750-5.
- Dubois, A., Lacouture, L., et Feuillet, C. (2010). *Les pesticides dans les milieux aquatiques, données 2007*. Commissariat général au développement durable, Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de la mer. France. Récupéré dans <http://www.developpement-durable.gouv.fr/Les-pesticides-dans-les-milieux.html>
- Duke, S.O. (2011). Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59, 5835-5841.
- Duke, S. O., and S. B. Powles. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319-325. NLM.
- Durkin, P.R. (2011). *Glyphosate: Human health and ecological risk assessment*. Final report. USDA/Forest Service, Southern Region. Atlanta, Georgia. SERA TR-052-22-03b. Récupéré dans [http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/Glyphosate\\_SERA\\_TR-052-22-03b.pdf](http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/Glyphosate_SERA_TR-052-22-03b.pdf)
- Dwivedi, U., and Bhardwaj, R. (1995). D1 protein of photosystem II: The light sensor in chloroplasts. *Journal of Biosciences*, 20(1), 35-47.
- Edler, L., and Elbrächter, M. (2010). *The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis*. In: Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Intergovernmental oceanographic commission. UNESCO.



- Eker, S., Ozturk, L., Yazici, A., Erenoglu, B., Romheld, V., et Cakmak, I. (2006). Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 10019-10025.
- Environmental Protection Agency. (1993). *R.E.D Facts: Glyphosate*. United States. EPA-738-F-93-011
- Fedtke, C., and Duke, O.S. (2005). *Chapitre 7, Herbicides dans: Plant toxicology (4e Édition)*. Édité par Bertold Hock; Erich F. Elstner. Taylor & Francis e-library, page 295. ISBN: 978-0-203-02388-4.
- Finazzi, G., and Forti, G. (2004). Metabolic flexibility of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by the link between state transitions and cyclic electron flow. *Photosynthesis research*, 82, 327-338.
- Folmar, L.C., Sanders, H.O., et Julin, A.M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 8, 269-278.
- Force, L., Critchley, C., et van Rensen, J.J.S. (2003). New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants. *Photosynthesis research*, 78, 17-33.
- Franz, J.E., Mao, M.K., et Sikorski, J.A. (1997). *Glyphosate : a unique global herbicide*. Oxford University Press.
- Gantt, E., Edwards, M.R., et Provasoli, L. (1971). Chloroplast structure of the *cryptophyceae*. *The Journal of cell biology*, 48, 280-290.
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M-C., et Séralini, G-E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262, 184-191.
- Giesy, J.P., Dobson, S. et Solomon, K.R. (2000). Ecotoxicological assessment for Roundup® Herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 165, 35-120.
- Giroux, I., et Pelletier, L. (2012). *Présence de pesticides dans l'eau au Québec : bilan dans quatre cours d'eau de zones en culture de maïs et de soya en 2008, 2009 et 2010*. Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement. ISBN 978-2-550-64159-9.
- Gorse, I., et Balg, C. (2012). *Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2009*. Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. ISBN 978-2-550-64375-3.

- Gorse, I., et Rivard, L. (2011). *Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2008*. Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs. ISBN 978-2-550-61586-6.
- Govindjee., Kern, J.F., Messinger, J., Whitmarsh, J. (2010). *Photosystem II*. Dans: Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons. Chichester.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., et Azevedo, R.A. (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional plant biology*, 32(6), 481-494.
- Gunes, A., Inal, A., Bagci, E.G., et Pilbeam, D.J. (2007). Silicon-mediated changes of some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach and tomato grown in sodic-B toxic soil. *Plant and soil*, 290(1-2), 103-114.
- Harris, J., and McCartor, A. (2011). *The world's worst toxic pollution problems: the top ten of the toxic twenty*. New York: Blacksmith Institute. Récupéré de <http://www.worstpolluted.org/files/FileUpload/files/2011/Worlds-Worst-ToxicPollution-Problems-2011-Report.pdf>
- Heath, R.L., and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125(1), 189-198.
- Helander, M., Saloniemi, I., et Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trend in plant science*, 17(10), 569-574.
- Herrmann, K.M. (1995). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The plant cell*, 7, 907-919.
- Hetherington, P.R., Reynolds, T.L., Marshall, G., et Kirkwood, R.C. (1999). The absorption, translocation and distribution of the herbicide glyphosate in maize expressing the CP-4 transgene. *Journal of experimental botany*, 50 (339), 1567-1576.
- Huang, J., Silva, E.N., Shen, Z., Jiang, B., et Lu, H. (2012). Effects of glyphosate on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and physiochemical properties of cocongrass (*Imperata cylindrical* L.). *Plant omics journal*, 5(2), 177-182.
- Jeffrey, S.W., Wright, S.W. et Zapata, M. (2011). *Microalgal classes and their signature pigments*. Dans: Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography. Cambridge University press. 874 pages.
- Joshua, S., and Mullineaux, C.W. (2004). Phycobilisome diffusion is required for light-state transitions in Cyanobacteria. *Plant physiology*, 135, 2112-2119.
- Juneau, P., Qiu, B. et Deblois, C. (2007). Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: *Reviews of Toxicological and Environmental chemistry*, 89(4), 609-625.

- Kaushik, I.S. (2010). Effect of herbicide with different modes of action on physiological and cellular traits of *Anabaena fertilissima*. *Paddy and water environment*, 8, 277-282.
- Kern, J., and Renger, G. (2007). Photosystem II : Structure and mechanism of the water : plastoquinone oxidoreductase. *Photosynthesis research*, 94, 183-202.
- Kielak, E., Sempruch, C., Mioduszevska, H., Kloczek, J., et Leszczyński, B. (2011). Phytotoxicity of Roundup Ultra 360 SL in aquatic ecosystems : Biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. *Pesticide biochemistry and physiology*, 99, 237-243.
- Kitchen, L.M., Witt, W.W., et Rieck, C.E. (1981). Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. *Weed Science*, 29(4), 513-516.
- Klöppel, H., Wördel, W., et Stein, B. (1997). Herbicide transport by surface runoff and herbicide retention in a filter strip, rainfall and runoff stimulation studies. *Chemosphere*, 35(1/2), 129-141.
- Kolpin, D.W., Thurman, E.M., Lee, E.A., Meyer, M.T., Furlong, E.T., et Glassmeyer, S.T. (2006). Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. *Science of the total environment*, 354, 191-197.
- Laitinen, P., Rämö, S., Nijunen, U., Jauhiainen, L., Siimes, K., et Turtola, E. (2009). Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil. *Plant soil*, 323, 267-283.
- Lewis Jr., W.M. (1976). Surface/Volume ratio: Implications for phytoplankton morphology. *Science*, 192, 885-887.
- Lewis, M.A. (1995). Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental pollution*, 87, 319-336.
- Lipok, J., Studnik, H., et Gruyaert, S. (2010). The toxicity of Roundup® 360 SL formulations and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73, 1681-1688.
- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., et Xu, R. (2006). Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63, 456-462.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., et Bellé, R. (2004). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the cell*, 96, 245-249.
- Marques, T.C.L.L.S.M.M., and Soares, A.M. (2011). Antioxidant system of ginseng under stress by cadmium. *Scientia agricola*, 68(4): 482-488.



- Marzabadi, M.R., Gruys, K.J., Pansegrau, P.D., Walker, M.C., Yuen, H.K., et Sikorski, J.A. (1996). An EPSP synthase inhibitor joining shikimate 3-phosphate with glyphosate: synthesis and ligand binding studies. *Biochemistry*, 35, 4199-4210.
- Mateos-Naranjo, E., Redondo-Gómez, S., Cox, L., Cornejo, J., et Figueroa, M.E. (2009). Effectiveness of glyphosate and imazamox on the control of the invasive cordgrass *Spartina densiflora*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72, 1694-1700.
- Maxwell, K., and Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51(345), 659-668.
- Miteva, L.P-E, Ivanov, S.V., et Alexieva, V.S. (2010). Alterations in glutathione pool and some related enzymes in leaves and roots of pea plants treated with the herbicide. *Russian journal of plant physiology*, 57(1), 131-136.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7 (9): 405-410.
- Modesto, K.A, and Martinez, C.B.B. (2010). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78, 294-299.
- Monsanto Canada. (2009). *Fiche de sécurité, produit commercial: Roundup Transorb® HC herbicide liquide*. Récupéré dans [http://www.monsanto.ca/products/Documents/roundup\\_transorb\\_msds\\_fr.pdf](http://www.monsanto.ca/products/Documents/roundup_transorb_msds_fr.pdf)
- Muñoz-Rueda, A., Gonzalez-Murua, C., Becerril, J.M., et Sánchez-Díaz, M.F. (1986). Effects of glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] on photosynthetic pigments, stomatal response and photosynthetic electron transport in *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*. *Physiologia Plantarum*, 66, 63-68.
- Nakano, Y., and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant cell physiology*, 22(5), 867-880.
- Orcaray, L., Zulet, A., Zabalza, A., et Royuela, M. (2012). Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. *Journal of plant physiology*, 169, 27-33.
- Organization for Economic Co-operation and Development. (2008). *Environmental Performance of Agriculture in OECD countries since 1990* (volume 4). OECD Publishing.
- Oxborough, K. (2004). Imaging of chlorophyll a fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of experimental botany*, 55(400), 1196-1205.
- Perkins, P.J., Boermans, H.J, et Stephenson, G.R. (2000). Toxicity of glyphosate and triclopyr using the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus*. *Environmental toxicology and chemistry*, 19(4), 940-945.

- Perron, M.-C., and Juneau, P. (2011). Effect of endocrine disrupters on photosystem II energy fluxes of green algae and cyanobacteria. *Environmental research*, 111, 520-529.
- Raven, P.H., Evert, R.F., et Eichhorn, S.E. (2007). *The biology of plants* (2e édition). Éditions De Boeck Université. Bruxelles.
- Reddy, K.N., Rimando, A.M., et Duke, S.O. (2004). Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 5139-5143.
- Relyea, R.A. (2012). New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicide induce antipredator morphology. *Ecological applications*, 22(2), 634-647.
- Rezg, R., Mornagui, B., El-Fazaa, S., et Gharbi, N. (2010). Organophosphorus pesticides as food chain contaminants and type 2 diabetes: a review. *Trends in food science & technology*, 21, 345-357.
- Roháček, K., Soukupová, J., et Barták, M. (2008). Chlorophyll fluorescence: A wonderful tool to study plant physiology and plant stress. *Plant cell compartments*, 41-104.
- Romero, D.M., Ríos de Molina, M.C., et Juárez Á.B. (2011). Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74, 741-747.
- Santé Canada. (1987). *Le glyphosate: document technique*. Récupéré de <http://www.hc-sc.gc.ca/cwh-semt/pubs/water-eau/glyphosate/index-fra.php>
- Schmitt-Jensen, M., and Altenburger, R. (2005). Toxic effects of isoproturon on periphyton communities – a microcosm study. *Estuarine coastal and shelf science*, 62, 539-545.
- Schreiber, U., Quayle, P., Schmidt, S., Escher, B.I., et Mueller, J.F. (2007). Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2554-2563.
- Schuette, J. (1998). *Environmental fate of glyphosate*. Environmental monitoring & pest management, Department of pesticide regulation. Sacramento. United States. Récupéré dans <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/glyphos.pdf>
- Scribner, E.A., Battaglin, W.A., Gilliom, R.J., et Meyer, M.T. (2007). *Concentrations of glyphosate, its degradation product, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate in ground- and surface-water, rainfall, and soil samples collected in the United States, 2001-06*. U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2007-5122.
- Séguin, F., Druart, J.-C., et Le Cohu, R. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on periphytic diatom communities in freshwater outdoor lentic mesocosms. *Annales de Limnologie*, 37(1), 3-8.

- Sergieiev, I.G., Alexieiva, V.S., Ivanov, S.V., Moskova, I.I., et Karanov, E.N. (2006) The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. *Pesticide. Biocesmistry and. Physiology*, 85(3), 139-146.
- Servaites, J.C., Tucci, M.A., et Geiger, D.R. (1987). Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity and metabolite levels in sugar beet leaves. *Plant physiology*, 85, 370-374.
- Singh, B.K., and Shaner, D.L. (1998). Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed technology*, 12, 527-530.
- Stachowski-Haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L. et de la Broise, D. (2008). Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquatic toxicology*, 89, 232-241.
- Statistiques Canada. (2011). *Série de rapports sur les grandes cultures: Estimation de Septembre de la production des principales grandes cultures*. Ottawa. No 22-002-X au catalogue, 90(7).
- Stein, J. (1972). *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements*. London: Cambridge University Press, 448 p.
- Stirbet, A., and Govindjee. (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 104, 236-257.
- Strasser, R. J., Srivastava, A., et Govindjee. (1995). Polyphasic chlorophyll alpha fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 61(1), 32-42.
- Strasser, R. J., Srivastava, A., et M. Tsimilli-Michael. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Dans: *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*, M. Yunus, U. Pathrc et P. Mohanty. London, Taylor & Francis.
- Struger, J., Thompson, D., Staznik, B., Martin, P., McDaniel, T., et Marvin, C. (2008). Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80, 378-384. DOI 10.1007/s00128-008-9373-1
- Sueoka, N., Chiang, K.S., et Kates, J.R. (1967). Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*; Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores. *Journal of Molecular Biology*, 25, 44-67.



- Sura, S., Waiser, M., Tumber, V., et Farenhorst, A. (2012). Effects of herbicide mixture on microbial communities in prairie wetland ecosystems: A whole wetland approach. *Science of the total environment*, 435-336, 34-43.
- Tsui, M.T.K, and Chu, L.M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 1189-1197.
- Tzin, V., and Galili, G. (2010). New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants. *Molecular plant*, 3(6), 956-972.
- Uehlinger, V. (1964). Étude statistiques des méthodes de dénombrement planctonique. *Archives des Sciences, Société De physique Et d'Histoire naturelle De Genève*, 17(2), 121-233.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J-R., et Kamiya, N. (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473, 55-60.
- Vendrell, E., Gómez de Barreda Ferraz, D., Sabater, A. et Carrasco, J.M. (2009). Effects of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: a microplate bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 538-542.
- Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G.L., Rodríguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, A., Zagarese, H., et Pizarro, H. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19, 710-721.
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science*, 61, 1139-1151.
- Vivancos, P.D., Driscoll, S.P., Bulman, C.A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., Mauve, C., Noctor, G., et Foyer, C.H. (2011). Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependant inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration. *Plant physiology*, 157, 256-268.
- Wang, C-Y. (2001). Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Weed technology*, 15, 628-635.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of plant physiology*, 144, 307-313.
- Wollman, F-A., and Lemaire, C. (1988). Studies on kinase-controlled state transitions in Photosystem II and *b<sub>6</sub> f* mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* which lack quinone-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 933, 85-94.

- Wong, P.K. (2000). Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. *Chemosphere*, 41, 177-182.
- Yanniccari, M., Tambussi, E., Istilart, C., et Castro, A.M. (2012). Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant physiology and biochemistry*, 57, 210-217.
- Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M.J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A., et Yachandra, V.K. (2006). Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn<sub>4</sub>Ca cluster. *Science*, 314, 821-825.
- Zaidi, A., Khan, Md.S., et Rivzi, P.Q. (2005). Effect of herbicides on growth, nodulation and nitrogen content of greengram. *Agronomy for Sustainable Development*, 25, 497-504.
- Zobiolo, L.H.S., de Oliveira Jr., R.S., Kremer, R.J., et Muniz, A.S. (2010). Nutrient accumulation and photosynthesis in glyphosate-resistant soybeans is reduced under glyphosate use. *Journal of plant nutrition*, 33, 1860-1873.
- Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira Jr., R.S., et Constantin, J. (2011). Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of "second generation" glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). *Pesticide biochemistry and physiology*, 99, 53-60.
- Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., de Oliveira Jr., R.S., et Constantin, J. (2012). Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 175, 319-330.